

Doktori értekezés Ph.D. fokozat elnyerésére



MULTIKOMPONENSES NÖVÉNYVÉDŐSZER-MARADÉK MEGHATÁROZÁS LEHETŐSÉGEI ÉLELMISZEREKBŐL TÖMEGSPEKTROMETRIÁS MÓDSZEREKKEL

KMELLÁR BÉLA

Doktori (Ph.D.) értekezése

Készült:
Budapesti Corvinus Egyetem
Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2011

Édesanyámnak...

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszer-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Fodor Péter**
Egyetemi tanár
az MTA doktora
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: **Dr. Fodor Péter**
Egyetemi tanár
az MTA doktora
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1 BEVEZETÉS	6
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Növényvédőszer használat	8
2.1.1 A növényvédőszerek csoportjai	9
2.1.1.1 Csoportosítás hatásuk alapján	9
2.1.1.2 Csoportosítás kémiai szerkezet alapján	10
2.2 Szabályozás	10
2.3 Növényvédőszer analitika	15
2.3.1 A növényvédőszer analitika hajnala	16
2.3.2 Modern multikomponenses peszticid meghatározási módszerek: extrakciós lehetőségek	16
2.3.2.1 „Dutch módszer”	17
2.3.2.2 „Alder módszer”	18
2.3.2.3 „QuEChERS”	19
2.3.2.4 Extraháló oldószerek	24
2.3.2.4.1 Acetonitril	25
2.3.2.4.2 Aceton	26
2.3.2.4.3 Etil acetát	27
2.3.2.4.4 Metanol	27
2.3.2.5 Mintatisztítás	27
2.3.2.6 Oldószerváltás	32
2.3.2.7 Egyéb analitikai paraméterek	34
2.3.2.7.1 pH	34
2.3.2.7.2 Sók használata az oldat víztelenítésére	36
2.3.2.7.3 Sók használata a folyadék-folyadék megoszlásban	36
2.3.2.8 Egyedi, tipikusan nem sokkomponenses módszerek (SRMs=Single Residue Methods)	37
2.3.5 Modern multikomponenses peszticid meghatározási módszerek: a mérés	39
2.3.5.1 GC alapú technikák	39
2.3.5.2 LC alapú technikák	46
2.3.5.2.1 Elválasztás	47
2.3.5.2.2 Ionizáció	48
2.3.5.2.3 Detektálás	50
2.3.6 Modern multikomponenses peszticid meghatározási módszerek: minőségbiztosítás	52
2.3.6.1 Szabályozás	52
2.3.6.2 Mátrixhatás	54
2.3.6.3 Kalibráció	55
2.3.6.4 Kísérő sztenderd használata	57
3 CÉLKITŰZÉSEK	59
4 ANYAG ÉS MÓDSZER	62
4.1 Vegyszerek és műanyag eszközök	62
4.2 Műszerek	63
4.2.1 HPLC-MS/MS	63
4.2.2 GC-MS/MS	65
4.2.3 GC×GC TOFMS	65
5 EREDMÉNYEK	67

5.1 Multikomponenses módszer (>150 peszticid) fejlesztése és alkalmazása LC-MS/MS technikával.....	67
5.1.1 Célskomponensek kiválasztása.....	67
5.1.2 Mérési paraméterek optimalizálása.....	68
5.1.3 Peszticidek azonosítása.....	71
5.1.4 Minta-előkészítés.....	73
5.1.5 Validálás.....	74
5.1.5.1 Linearitás és mátrixhatás.....	74
5.1.5.2 Minta-előkészítés hatékonysága: a kinyerési hatásfok vizsgálata..	76
5.1.5.3 Kimutatási határ.....	79
5.1.5.4 Ismételhetőség.....	80
5.1.6 Valódi minták mérése.....	81
5.1.7 Következtetések.....	82
5.2 Mérési paraméterek hatásainak vizsgálata 150 peszticid meghatározhatóságára LC-MS/MS technikával.....	84
5.2.1 Folyadékkromatográfia.....	84
5.2.1.1 HPLC oszlop 5 µm szemcsemérettel.....	84
5.2.1.1.1 Az ionizációt segítő anyagok hatása a retencióra.....	84
5.2.1.1.2 Az oszlop termosztálás hatása a retencióra és a csúcsterületekre.....	85
5.2.1.2 UHPLC oszlop 1,8 µm szemcsemérettel.....	87
5.2.2 Tömegspektrometria.....	90
5.2.2.1 Az ionizációt segítő anyagok hatása az ionizációra.....	90
5.2.2.2 A sztenderd keverék oldatok hatásai a meghatározásra.....	92
5.2.2.3 Izobár átmenetek.....	94
5.2.3 Következtetések.....	96
5.3 Két módszer fejlesztése és kombinálása 300 peszticid minőségi és mennyiségi meghatározására LC-MS/MS technikával.....	97
5.3.1 LC-MS paraméterek.....	97
5.3.2 Minta-előkészítés.....	98
5.3.3 Minőségi és mennyiségi módszerek kombinálásának koncepciója.....	98
5.3.4 300 peszticid minőségi azonosítása (EPI „screening” módszer).....	101
5.3.4.1 A módszer jellemzői.....	101
5.3.4.2 Téves pozitív találatok.....	105
5.3.4.3 Téves negatív találatok.....	106
5.3.4.4 Előnyök és hátrányok.....	107
5.3.5 Az előzetesen azonosított peszticidek mennyiségi meghatározása.....	109
5.3.5.1 Módszerfejlesztés.....	109
5.3.5.2 Előnyök és hátrányok.....	110
5.3.5.3 Mátrixhatás és kalibráció egyenesek adatbázisa.....	112
5.3.6 Egyéves rutin alkalmazás: magyar minták mérése.....	115
5.3.7 Következtetések.....	118
5.4 Módszerfejlesztés néhány klórartalmú peszticid meghatározására fűszerekből és teából GC-MS/MS és GC×GC TOFMS technikákkal. Egy összehasonlító tanulmány.....	119
5.4.1 Peszticidek és mátrixok kiválasztása.....	119
5.4.2 Minta-előkészítés.....	120
5.4.3 GC-MS/MS módszer kidolgozása és mérési paraméterek.....	121
5.4.4 GC×GC TOFMS módszer kidolgozása és mérési paraméterek.....	123
5.4.5 Mátrixhatás.....	127

5.4.5.1 Fűszerek mátrixhatása	127
5.4.5.2 Tea	133
5.4.6 Fő analitikai paraméterek	134
5.4.6.1 Linearitás	134
5.4.6.2 Kinyerési hatásfok.....	134
5.4.6.3 Kimutatási határ (LOD) – mennyiségi mérés határok (LOQ).....	136
5.4.7 Nem-célkomponensek keresése GC×GC TOFMS műszerrel	137
5.4.8 Következtetések	139
6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	140
7 ÖSSZEFOGLALÁS	143
8 SUMMARY.....	145
9 IRODALOMJEGYZÉK.....	147
10 MELLÉKLETEK.....	159
10.1 Ábrák	159
10.2 Táblázatok	163

1 BEVEZETÉS

Közel 50 éve, Rachel Carson 1962-ben megjelent Néma tavasz című műve – bár nem tudományos alkotás, felnyitotta az akkori tudósok és értelmiség szemét, hogy az új kor kemikáliái mekkora veszélyt is jelentenek a környezetünkre. A mezőgazdasági vegyszerek széles skálájának túlzott használata nemcsak a célnövényre vagy a célszervezetre hatnak, hanem előre nem látható hosszú távú káros hatásai lehetnek mely akár ökológiai katasztrófához is vezethet. A mai zöld mozgalmak - köztük a Green Peace - megalakulása is erre az időszakra tehető.

A civilizáció, a növekvő termelés és termékigény több termőterületet igényelt, a gépiesítés fejlődése pedig lehetővé tette és elősegítette a minél nagyobb termés hozamok elérését. Bár már az ókori sumérok is használtak növényvédőszerként elemi kén, a mostani értelemben vett növényvédőszer használatát a 20. század elején kezdték el. A termés hozamot befolyásoló tényezők közül - bár az időjárást nyilvánvalóan nem lehet -, megpróbálták minél több tényező negatív hatását kemikáliákkal kiküszöbölni. A főként gyomok, rovarok, gombák és vírusok elleni szerekkel a maximális termés hozam, a betakarítás utáni (ú.n. post-harvest) szerekkel pedig a hosszabb eltarthatóság biztosítható. Az élelmiszereknek azonban a mai elvárásoknak is meg kell felelniük, melyeket gyakran olyan kulcsszavak mögé bujtatunk, mint a „bio” vagy a „biztonságos” élelmiszer. A „bio” zöldség vagy gyümölcs feltételezi a növényvédőszer teljes elhagyását termesztés és tárolás során, míg a „biztonságos élelmiszer” engedélyezi azok mérsékelt alkalmazását. A vélemények a fogyasztók és a kutatók közt is eltérőek. Míg a „bio” élelmiszerekkel érvelők természetesen a vegyszermentesség pozitívumát emelik ki, addig a „biztonságos élelmiszer” mellett pálcát törők csoportjának véleményét jól tükrözi Ben Kantack entomológus professzor egyik nyilatkozata, miszerint:

„Jobban szeretnék egy olyan salátát találni a boltban, ami 0.1 milliommód (ppm) koncentrációban tartalmaz növényvédőszer maradékot, mint egy csótányt felfedezni a salátában 40-50 fertőző mikroorganizmussal a lábai közt.”

A fenti két csoport mellett természetesen van egy harmadik: a „nem biztonságos” élelmiszerek. Azt, hogy valamely élelmiszer biztonságos vagy nem, élettani illetve szabályozási szempontból is vizsgálhatjuk. Biztonságos, ha az arra hivatott törvényhozó szervezet által meghatározott határkoncentrációnál (ú.n. MRL=Maximum Residue Level) kisebb a termékben található kérdéses kemikália koncentrációja. Ezek a határértékek nem minden esetben azonosak az élettani határértékekkel (általában kisebbek), melynek fő oka a törvényhozók és az agrárium képviselőinek érdekellentéte. A törvényhozók célja a fogyasztók védelmében a határértékek minél alacsonyabb szintre szorítása, míg a termelőknek szükségük van vegyszerek használatára a megfelelő termés hozam eléréséhez. A mezőgazdasági termés hozam pedig ökonómiai kérdés, amit a törvényhozásnak figyelembe kell vennie, így a határértékek ilyen kompromisszumok eredményei.

A kompromisszumoknak csak akkor van értelmük, ha azokat betartják, ezért ezt ellenőrizni is kell.

Az analitikusok célja nem a határértékek betartása vagy betartatása, hanem olyan objektív módszerek, méréstechnika kidolgozása, eredmények szolgáltatása, amellyel a fent vázolt ellenőrzés és döntés kivitelezhető. Nem csak ezt kell azonban szem előtt tartani. Fontos hogy az analitika gyors és költség-hatékony legyen, ami mérési gyorsaságot, a minta-előkészítés oldószerigényének csökkentését és az egy méréssel meghatározható komponensek számának maximalizálását jelenti analitikai információvesztés nélkül. Az analitikai méréstechnika és a számítástechnika együttes fejlődése új, eddig zárt ajtókat nyitott meg a sokkomponenses növényvédőszer analitikában is, melyek összefoglalására és lehetőségeire PhD értekezésemben teszek kísérletet.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Növényvédőszer használat

A növényvédőszer, más néven peszticidek olyan vegyszerek, melyek alkalmazásának célja a növények, termények védelme, és a kártevő élőlények elpusztítása. A peszticid szó a latin eredetű *pestis* (járvány) és a *caedere* (megöl) szavak összetételéből keletkezett, s jelentése nyilvánvalóvá teszi, miről is van szó: nem védelemről, hanem megsemmisítésről. Nem csoda, hiszen a különféle peszticideket nem azért találták ki, hogy megvédjék az embert a kártékony rovaroktól és gyomoktól. Eredetileg vegyi hadviselésre fejlesztették ki. Csak később ismerték fel, hogy ezek a vegyszerek bevethetők a természet ellen is. Azóta napról napra észrevétlenül dül a hadviselés, amelynek elszenvedője végül is maga az ember.

Az egyik leghíresebb vagy inkább leghírhedtebb növényvédőszer a legtöbb helyen ma már betiltott *diklór-difenil-triklór-etán*, közismert nevén a *DDT*. A DDT-t 1874-ben Othmar Zeidler hozta létre, sikertörténete azonban 1934-ben kezdődött, amikor Paul Hermann Müller felfedezte annak rovarölő tulajdonságát, amiért 1948-ban orvosi Nobel-díjat kapott **[internet 1]**. A DDT fénykorát a 2. világháborútól a 60-as évek derekáig élte, majd használatát az európai országokban és Amerikában is fokozatosan betiltották.

A növényvédelmi kémia, a növénytermesztési kísérletek és a gépesítés fejlődésével a DDT mellett új, gyorsabban bomló növényvédőszer jelent meg a piacon a huszadik század második felétől. A peszticid analitika ezt a változást illetve bővülést - ahogy erre később részletesen ki is térek -, követte az utóbbi évtizedekben. Azt, hogy a növényvédőszer robbanásszerű fejlődésen mentek keresztül, jól mutatja a hatóanyagok száma. Míg a huszadik század közepén pár tízre tehető a forgalomban lévő hatóanyagok száma, addig ma, a huszonegyedik század első évtizedének végén ez a szám - a szintén káros bomlástermékekkel együtt -, az ezret is meghaladja **[FERNÁNDEZ-ALBA, 2008]**. Ennek egyenes következménye, hogy szükséges ezeket valamilyen rendszerbe foglalni.

2.1.1 A növényvédőszer-csoportjai

A növényvédőszereket alapvetően két szempont szerint lehet csoportosítani: kémiai szerkezetük, illetve hatásmechanizmusuk alapján. A két osztályozás egymástól nem teljesen független, hiszen a hasonló szerkezetű peszticidek hasonló hatásmechanizmussal működnek és *vica versa*, a hasonló hatásmechanizmust egymáshoz általában hasonló szerkezetű molekulák váltják ki. Ez azonban nem örök érvényű és nem vonatkozik minden növényvédőszerre. Analitikai értelemben a szerkezeti besorolás fontosabb, hiszen a peszticidek kémiai tulajdonságai határozzák meg a célravezető analitikát, elsősorban az elválasztás technikát. Hatásmechanizmus alapján azonban jóval kevesebb, karakterisztikus csoport különíthető el. Minden peszticidre általánosságban elmondható, hogy egy bizonyos kémiai csoportba sorolhatóak, hatásuk alapján pedig minimum egy csoportba. Könnyen belátható, hogy egy molekula hatását több célszervezetre is kifejtetheti. A csoportosítást áttekintő jelleggel - a teljesség igénye nélkül - végzem. A nemzetközi szakirodalom publicitása miatt a kifejezések angol megfelelőit fontosnak tartom zárójelben közölni.

2.1.1.1 Csoportosítás hatásuk alapján

Minden peszticidről elmondható, hogy az élő szervezetek alapvető biológiai vagy biokémiai folyamatait gátolják vagy állítják le teljesen vagy - állatok esetében - az idegrendszerre hatnak. A célszervezetek típusa szerinti csoportjaik a következők:

- rovarirtó (insecticide)
- gyomirtó (herbicide)
- gombaölő (fungicide)
- növekedést szabályozó (growth regulator)
- atkaölő (acaricide)

- fonálféregölő (nematicide)
- baktériumölő (bacteriocid)
- rágcsálóirtó (rodenticide)
- algaölő (algicide)
- antibiotikus (antibiotic)
- madárirtó (avicide)
- darázsirtó (vespacide)
- csigairtó (molluscicide)
- atkairtó (miticide) szerek.

A három legjelentősebb és legnépesebb tagú csoport a rovarirtó, gyomirtó és gombaölő szerek.

2.1.1.2 Csoportosítás kémiai szerkezet alapján

Szerkezetük alapján való csoportosításuk széles, az összes csoport felsorolása nem indokolt, megtalálhatóak a *pesticides-online* [internet 2] weboldalon. A legjelentősebbek a szerves klórtartalmú (organochlorine), a szerves foszfortartalmú (organophosphorus), a piretroid (pyrethroid), a karbamát (carbamate) és az urea (urea) peszticidek.

2.2 Szabályozás

Magyarországon 2004. május 1-től, az Európai Unióhoz való csatlakozástól kezdve, az addig érvényben lévő FVM rendeletet a növényvédőszeres megengedhető maximális értékéről [17/1999. (VI.16.) EüM rendelet: internet 3] felváltotta az EU-ban 1991 óta hatályban lévő rendelet [Directive 91/414 EEC: internet 4]. A rendelet meghatározza a peszticid és a maradék definícióját is, melynek közlését elengedhetetlennek tartom a pontosság kedvéért. A peszticidek olyan „*hatóanyagok és készítmények, amelyek egy vagy több hatóanyagot tartalmaznak olyan formában, ahogy a felhasználóhoz eljutnak, melynek célja:*

- (i) *a növények és növényi termékek védelme minden kártékony szervezet ellen, illetve azok megelőzése*
- (ii) *a növények növekedésének befolyásolása, kivéve a tápanyagokat (például növekedés szabályozók)*
- (iii) *termések védelme*
- (iv) *gyomnövények irtása*
- (v) *a növény egyes részeinek irtása, a nemkívánatos növények szabályozása és megakadályozása”.*

A maradék „egy vagy több hatóanyag, mely jelen van a növényben vagy a növényen vagy a növényi eredetű termékben, élelmezési célra alkalmas állati eredetű termékekben vagy bárhol a természetben, amely növényvédőszer használatából ered, beleértve azok közti-, bomlás és reakciótermékeit is”.

Dolgozatomban a növényvédőszer és a peszticid kifejezéseket egymás szinonimáiként fogom használni.

Az európai peszticid szabályozás taglalása előtt szükségesnek tartom a világ és Európa peszticid-szabályozási mechanizmusát bemutatni.

Világszinten a **FAO** (Food and Agriculture Organization) és a **WHO** (World Health Organization) foglalkozik minden élelmiszerrel, mezőgazdasággal és egészséggel kapcsolatos kérdéssel, valamint kezeli az esetlegesen fellépő krízishelyzeteket. A két szervezet munkája segíti és tanácsokkal látja el a **Codex Alimentarius Commission** világszervezetet, mely élelmiszerekkel kapcsolatos kérdésekben tartja a kapcsolatot minden ország erre szakosodott hivatalával. A szervezet tagja Magyarországon a Magyar Élelmiszerbiztonsági Hivatal (MÉBH). A szennyezőanyagok élelmiszerekben megengedhető maximális értékeit határozza meg illetve irányozza elő, ezek az irányértékek azonban nem örök érvényűek, nem vonatkoznak minden országra. Ha egy közösségnek saját szabályozása van, akkor ezt a szabályozást csak irányként kell követnie, rá a saját szabályozási rendszere vonatkozik. Az Európai Unió, az Egyesült Államok, Kanada, Ausztrália, Japán is saját szabályozási rendszerrel rendelkezik. A nagy területi egységeket is több egymással együttműködő, de különböző szakmai területeket lefedő szervezetek

irányítják. Az USA-ban például az **EPA** (Environmental Protection Agency) és az **FDA** (Food and Drug Administration) egymással, valamint a **FAO**, a **WHO** és a **Codex Alimentarius Commission** világszervezetekkel konzultálva látja el a szabályozási és ellenőrzési feladatait. Az Európai Unióban élelmiszer szabályozását három nagy szervezet látja el.

Az **EFSA** (European Food Safety Authority) szervezete tudományos alapokra helyezve vizsgálja az élelmiszerekben előforduló szennyező anyagok hatásait a fogyasztókra az EU tagállamaiban, kockázatelemzést végez és ezekre a tanulmányokra alapozva javaslatokat tesz MRL értékek bevezetésére vagy módosítására. A szervezet központja az olaszországi Parma-ban van.

Az **FVO** (Food and Veterinary Office) vizsgálja az EU tagállamai közötti kereskedelmet, valamint a harmadik országokból (Törökország, Marokkó, Algéria, Kína) az EU-ba érkező importot. A szennyezőanyagok határértékei eltérőek lehetnek a harmadik országokban, ezért az azokból importra szánt mezőgazdasági termékek termelését szabályozza és felügyeli, valamint a beérkező termékeket és azok ellenőrzését követi nyomon.

Mindkét szervezet javaslatokkal segíti a **DG SANCO** (European Commission Health and Consumers Directorate-General) európai szervezet munkáját, melynek központja Brüsszelben van. A szervezet határozza meg az EU élelmiszerekre vonatkozó direktíváit, előírányozza a jó mezőgazdasági gyakorlatot (GAP), meghatározza a szennyezők élelmiszerekre vonatkozó MRL értékeit, valamint harmonizálja azokat. A szennyezők mérésére szakosodott kiemelt fontosságú közösségi referencia laboratóriumok is a DG SANCO közvetlen irányítása alá tartoznak. A DG SANCO egyik feladata a növényvédőszer szabályozás, mely két nagy ágra bontható. Egyrészt szabályozza a peszticidek mérésére szakosodott akkreditált laboratóriumok működését, másrészt pedig rendszerbe foglalja és szabályozza az MRL értékeket és a mátrixokat.

A laboratóriumok munkáját is szabályok közé szorítják. Mint minden rutinanalitikát végző laboratóriumnak, úgy a peszticideket mérőknek is **jó laboratóriumi gyakorlattal (GLP)** kell rendelkezniük. Alapfeltétel az **ISO**

17025 szerinti akkreditáció és európai körmérésekben való részvétel. A mintakezeléssel, minta-előkészítéssel, mérésekkel és eredmények szolgáltatásával kapcsolatos szabályokat az erre összehívott szakmai csoport többszörös egyeztetések után határozta meg, melyet először 2007-ben, a **No.SANCO 3131/2007 [internet 5]** dokumentumba foglaltak. Ennek a pontosításra illetve bővítésre szoruló részére, hiányosságaira a rutin analitikában való alkalmazása hamar rávilágított. Ezért a dokumentum egy bővített és pontosított verziója, a **No.SANCO 10684/2009 [internet 6]** lépett hatályba 2010 január 1-től. A mérés technikával, fejlesztésekkel, mátrixokkal és azok minta-előkészítésével kapcsolatos kérdések megválaszolására az EU-ban négy közösségi referencia laboratóriumot (CRL=Community Reference Laboratory) hoztak létre **[internet 7]**, melyek neve 2010. február 1-től EURL-re (European Union Reference Laboratory) változott. Ezek a következők:

- Zöldségek és gyümölcsök referencia laboratóriuma, Almería, Spanyolország
- Gabonafélék és takarmányok referencia laboratóriuma, Soeborg, Dánia
- Állati termékek referencia laboratóriuma, Freiburg, Németország
- Egyedi módszerek referencia laboratóriuma, Stuttgart, Németország

A közösség minden országának van egy nemzeti referencia laboratóriuma (NRL=National Reference Laboratory) amely a felmerülő kérdésekkel bármelyik közösségi referencia laboratóriumhoz fordulhat, az országokban működő hivatalos méréseket végző laboratóriumok pedig a saját nemzeti referencia laboratóriumukkal konzultálnak. A tagállamok a peszticidek hivatalos mérését felügyelő és koordináló mezőgazdasági vagy egészségügy minisztériumok kötelesek az élelmiszerlánc teljes hosszában, a termelőktől a fogyasztókig valamint az országba importtal kerülő mezőgazdasági termékeket a határon ellenőriztetni.

Az Európai Közösség 1991. július 15-én hatályba lépett rendelete (**91/414 EEC**) szabályozza a növényvédőszer forgalomba hozatalát a közösségen

belül. 1976 óta szabályozza a növényvédőszer élelmiszerekben megengedhető legnagyobb koncentrációját gabonafélékben (86/362 EEC), állati eredetű termékekben (86/363 EEC), zöldségekben és gyümölcsökben (76/895 EEC), valamint más növényi eredetű élelmiszerekben (90/642 EEC). 2008. szeptember 1-ig ez egy megosztott felelősség volt a közösség és a tagállamok között, így több mint 45000 MRL-t szabtak meg 245 peszticidre a fent említett mátrixokban. Emellett a tagállamok saját nemzeti határértékeket is szabhattak, hogy védjék a fogyasztóikat, és hogy elősegítsék a kereskedelmet. Az 1991-es 91/414 EEC rendelet 2005-ben módosításra és a mátrixok rendszerezésével való kibővítésére került **(Regulation (EC) No 396/2005)** [internet 8]. A tagállamok közötti felgyorsult nemzetközi kereskedelem miatt a bonyolult határértékrendszer használata nehézkessé vált, ami miatt 2008. szeptember 1-től egy teljesen harmonizált határértékrendszer lépett hatályba. A 2005-ös rendelet (Regulation (EC) No 396/2005) mellékletei (Annex) tartalmazzák a peszticid határértékkel kapcsolatos minden információt, melyek a következők:

- *Annex I: a termékek listája, melyekre az MRL értékek vonatkoznak. Zöldségeket, gyümölcsöket, fűszereket, gabonaféléket és állati eredetű termékeket, összesen 315 terméket tartalmaz.*
- *Annex II: Azon peszticid MRL-ek listája, azok MRL értékeinek megerősítése, melyek 2008. szeptember 1. előtt is léteztek, 245 peszticidet tartalmaz.*
- *Annex III: Az EU úgynevezett ideiglenes MRL listája. A harmonizációs folyamat eredménye és azokat a peszticideket tartalmazza, melyekre 2008. szeptember 1. előtt csak nemzeti határértékek léteztek. Összesen 471 peszticidet tartalmaz.*
- *Annex IV: Azon peszticidek listája (52 darab), melyekre az alacsony veszélyük miatt nem szükséges MRL értéket megállapítani.*
- *Annex V: Azon peszticidek listáját fogja tartalmazni, melyekre az alapértelmezett 0.01 mg/kg határértéktől különböző vonatkozik. Ezt a listát még nem publikálták.*

- ***Annex VI:** Az MRL-ekre vonatkozó átszámítási faktorokat fogja tartalmazni feldolgozott élelmiszerekre. Ezt a listát még nem publikálták.*
- ***Annex VII:** Füstölőszerként alkalmazott peszticidek listáját tartalmazza, melyeket az egyes tagállamok engedélyeznek a termékek kezelésénél forgalomba hozataluk előtt.*

Ha a növényvédőszer egyik fenti listában sem szerepel, akkor az alapértelmezett 0.01 mg/kg határérték vonatkozik rá.

A határértékekhez való gyors hozzáférést az Európai Unió online peszticid adatbázisa (**EU Pesticide Database**) nagyban megkönnyíti [**internet 9**].

2.3 Növényvédőszer analitika

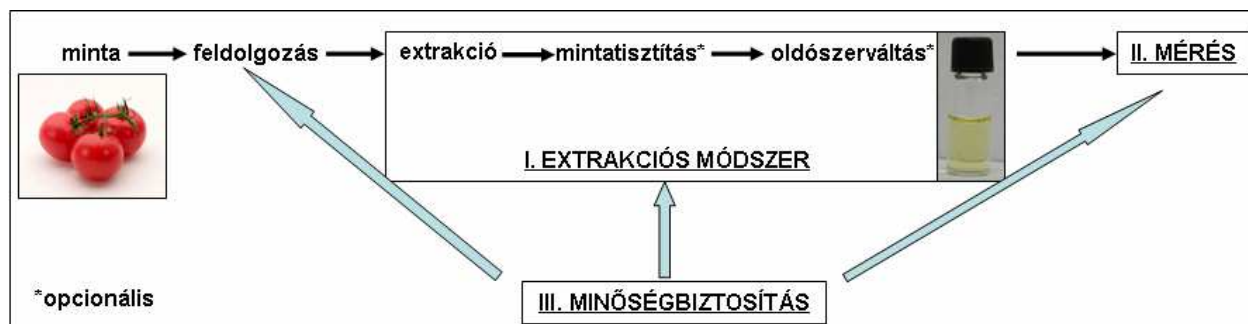
Mint ahogy az élelmiszer analitika minden területén, úgy a növényvédőszer analitika is rohamos fejlődésen ment keresztül az utóbbi évtizedekben. A műszerezettség, a számítástechnika és az automatizálás előrelépései lehetővé tették a kutatók számára az addig fel sem merülő kérdések megfogalmazását. A költséghatékonyság érdekében egyre több peszticid meghatározását tűzték ki célul, minél kevesebb erőforrás felhasználásával. A végső célt, hogy minden peszticidet minden mintából egyszerre lehessen meghatározni, egészen biztosan nem lehet elérni. Ennek az oka a növényvédőszerek eltérő kémiai tulajdonságában rejlik, ezért ez determinálja az analitikai technikát és részben a minta-előkészítést is. Az elválasztás-technikai-detektálási rendszerek alapvetően az analitika kivitelezésének eszközei, azonban az analízis igazi „Achilles-sarka” a minta-előkészítés. Hiába tudja mérni egy elválasztás-technikai-detektálási rendszer a célkomponenst, ha azt a mintából nem lehet megfelelően kivonni. A minta-előkészítésnek figyelembe kell vennie a meghatározandó (ismert vagy ismeretlen) komponensek kémiai tulajdonságait, a mátrixot, amiből azokat meghatározzuk és az elválasztás-technikai-detektálási technikát, amivel azokat meghatározzuk.

2.3.1 A növényvédőszer analitika hajnala

Az első multikomponenses módszereket az 1960-as években fejlesztették ki. Egészen az 1980-as évek végéig a detektálási technikát valamilyen nem-tömegszelektív módszer képezte. Elválasztás-technika (GC) után nitrogén-foszfor (NPD), lángfotometriás (FPD), lángionizációs (FID) és elektronbefogásos (ECD) detektorokat alkalmaztak, melyekkel csak egyes elemeket vagy funkciós csoportokat tartalmazó peszticidek határozhatóak meg, mint a szerves klór, foszfor vagy nitrogéntartalmú peszticidek [BRINKMAN, 1979; SCHÖDERGREN, 1978; TELLING, 1977; DICKENS, 1979]. Következésképpen e technikák a kiterjeszthetőség szempontjából saját korlátaik közé voltak szorítva. Gyakran jelentkezett a vizsgált peszticidekkel együtt extrahálódó mátrixkomponensek zavaró hatása, melynek oka az volt, hogy a florisilt vagy aktív szenet alkalmazó mintatisztítás nem volt elég hatékony a nem szelektív detektálás szempontjából. A nagyobb mértékű mintatisztítás részben megoldása lehet a problémának, de fennáll a veszélye a célpeszticidek tisztítás közbeni elvesztésének. A másik alternatíva a szelektívebb detektálás, amelyre akkoriban technikailag nem volt lehetőség. Ezért a multikomponenses módszerek korai szakaszát a minta-előkészítési és analitikai korlátok feszegetése jellemezte, jelentős áttörést azonban nem tudtak elérni.

2.3.2 Modern multikomponenses peszticid meghatározási módszerek: extrakciós lehetőségek

Ahhoz, hogy a multikomponenses peszticid meghatározási módszerekkel hogyan lesz egy zöldség, gyümölcs, olaj, fűszer vagy akármilyen mintából a mérés végeztével számszerű növényvédőszer koncentráció, egy analitikai folyamaton kell végigmennie. A sokkomponenses peszticid módszerek folyamatát az **1. ábrán** szemléltetem.



1. ábra Multikomponenses peszticid meghatározási módszerek folyamatábrája

A mintát természetesen darálni, homogenizálni kell, hogy az analízisre bemért minta reprezentálja az úgynevezett nagymintát, amiből az származott. A feldolgozás kritériumait a SANCO rendelet (No.SANCO 10684/2009) [internet 6] átfogóan szabályozza. A folyamat további részét három nagy egységre: extrakciós módszer, mérés és minőségbiztosítás részekre bontottam. A szerves oldószerral való extrakció alapvető, a mintatisztítás és az oldószerváltás pedig opcionálisan alkalmazható lépések, de egymástól logikailag nem elválaszthatóak, ezért ebben a fejezetben mindhárommal, összefoglalva az extrakciós módszerekkel foglalkozom.

2.3.2.1 „Dutch módszer”

Ezt az acetont használó módszert 1983-ban fejlesztették és azóta folyamatosan alkalmazták a holland peszticid monitorozási programban. A szakirodalomban ezért „Dutch módszer”-ként ismert [LUKE, 1981]. Ez a „Luke módszer” [LUKE, 1975] miniatürizált és korszerűsített változata, lépései röviden a következők:

- (i) 15 g minta (poláros peszticidek kivonására 7,5 g minta) + 30 ml acetonnal rázatás
- (ii) + 30 ml diklórmétán + 30 ml petróleum éter (poláros peszticidek kivonására + 7,5 g Na_2SO_4), majd rázatás. Ez a folyadék-folyadék megoszlási lépés.

- (iii) Centrifugálást követően GC mérésekhez 15 ml felülúszó elpárologtatása után 3 ml izo-oktán-toluol (9:1) oldatba, LC mérésekhez pedig 2 ml elpárologtatása után 1 ml metanolba való visszaoldása történik, amely ekvivalens milliliterenkénti 0,9 g illetve 0,36 g mintával.

A módszer alkalmazásáról számos publikáció született a QuEChERS módszerek megjelenéséig [DE KOK; 1987, 1992, 1994, 1995 és HIEMSTRA; 1995, 1999], majd ezután a QuEChERS-hez való összehasonlító tanulmányok váltak tendenciózássá. Előnye, hogy ezzel eltérő kémiai tulajdonságú peszticidek széles skáláját lehet extrahálni, és hogy a módszer kompatibilis GC és LC mérésekre is. Hátránya azonban, hogy nagy az oldószerigénye (>90 ml/minta) és diklór-metánt alkalmaz, melynek használatának beszüntetésére ösztökélték az analitikusokat a 1990-es években. Manapság a növényvédőszer analitikában csak néhány publikáció jelenik meg, mely a „Dutch módszer”-t használja.

2.3.2.2 „Alder módszer”

A Lutz Alder német analitikus irányítása alatt fejlesztett, 2003-ban publikált módszer [KLEIN, 2003] nem vált széles körben alkalmazottá, mégsem hagyható említés nélkül. Háttérbe szorulásának oka, hogy (i) metanolt használ extrakciós oldószerként, ami az acetonitrilhez képest gyengébb eluens és extraháló szer, ezért folyadékkromatográfiában is az acetonitril a preferáltabb és (ii) egyidőben jelent meg az acetonitrilt használó QuEChERS technikával, ami pont az acetonitril és a műszerekhez való kompatibilitása miatt kapott nagyobb figyelmet és publicitást.

Az „Alder módszer” lényege, hogy 10 g mintát kever össze 20 ml metanollal, majd centrifugálja és 6 ml felülúszót további tisztításnak veti alá. A felülúszó nem tiszta metanol, mert a metanol vízzel elegyedik, ezért tartalmaz bizonyos mennyiségű vizet. Ennek elvonására a 6 ml metanol-víz extraktumhoz 2 ml tömény sóoldatot adagol, majd a már tiszta metanolos felülúszóból 5 ml-t

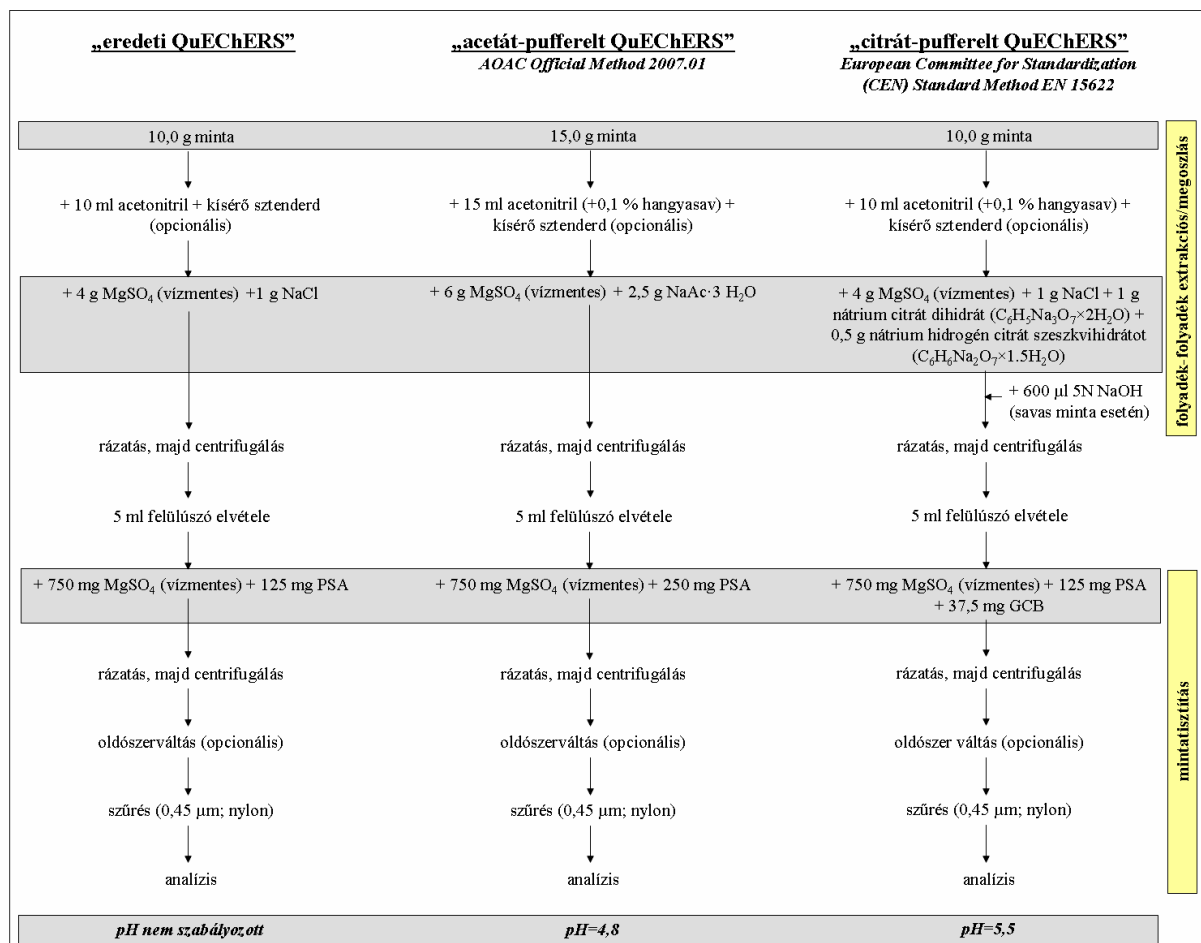
elvesz és egy szilárd fázisú extrakciós (SPE) töltetes oszlopra adagolja. Az oszlopról 16 ml diklórmétánnal eluálja a komponenseket, majd a kémcsőben összegyűjtött diklórmétános extraktumot szárazra párolja és visszaoldja 250 µl metanolba, amit további 1 ml vízzel hígít. Természetesen az extraktumot analízis előtt szűri. Az így nyert minta (1,25 ml) 1 g bemért nagy víztartalmú mintát reprezentál. A módszer hatékonyságát 108 peszticiden vizsgálta 7 mátrixban, a célpeszticidek 20 különböző kémiai csoportba tartoznak reprezentálva ezzel a módszer széleskörű alkalmazhatóságát. A módszert átalakítva: a metanolt etil-acetáttal helyettesítve is tesztelte. Bár az etil-acetátot nagyon jó extraháló szernek találta, mert sokkal kevesebb mátrixkomponenst old ki a mintából, mint a metanol; a szerző mégis a metanol mellett döntött, mert az jobban illeszthető folyadékkromatográfiás mérésekhez. A vizsgált peszticid-mátrix párok hozzávetőlegesen 60%-a mutatott megfelelő kinyerési hatásfokot és precizitást, továbbá 9 peszticid bomlott vagy oxidálódott a minta-előkészítés és tisztítás során. A módszer tehát alkalmas multikomponenses peszticid monitorozásra, az alacsony kinyerési hatásfokot mutató komponensek miatt azonban azok mennyiségi mérésre való alkalmazhatósága megkérdőjelezhető.

2.3.2.3 „QuEChERS”

A huszadik század utolsó négy évtizedében egyik publikált módszer sem törekedett igazán a minta-előkészítés lépéseinek és az ahhoz használt oldószer mennyiségének csökkentésére. Ma már kijelenthetjük, hogy Anastassiades és Lehotay 2003-ban megjelent publikációja [ANASTASSIADES, 2003] korszakalkotónak bizonyult, melyben a lehető legjobban próbálták egyszerűsíteni az extrakciós módszert úgy, hogy az alkalmas legyen nagyszámú peszticid hatékony extrakciójára. Módszerüket, melynek használata azóta széles körben elterjedt, „QuEChERS”-nek nevezték el, mely a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, azaz a Gyors, Egyszerű, Olcsó, Hatékony, Robusztus és Biztonságos szavak kezdőbetűiből alkotott mozaikszó. A módszer két fő lépésből áll: az acetonitriles

extrakció/megoszlási lépést egy diszperzív szilárd fázisú extrakció („dispersive SPE”) követ. 10 g előzetesen homogenizált nagy víztartalmú mintához 10 ml acetonitrilt, valamint 4 g vízmentes MgSO_4 -ot és 1 g NaCl -ot adagolnak. Rázatás és centrifugálás után az acetonitriles felülúszó egy részét további tisztításnak vetik alá, amely a szerkezeti vizet és a mintából kioldódó poláros mátrixkomponenseket hivatott eliminálni. Az acetonitriles felülúszó 1 ml-éhez 150 mg vízmentes MgSO_4 -et és 25 mg PSA-t (primary secondary amine; szorbens) adagolnak, majd rázatás és centrifugálás után az acetonitriles felülúszót leszűrik és ebben a formában, vagy oldószert váltva injektálják az analitikai rendszerbe. Ebben a tanulmányban a szerzők a vizsgált nagyon poláros (methamidophos, acephate) és apoláros peszticidekre is jó kinyerési hatásfokokat értek el GC-MS technikával. A módszer előnye, hogy mennyiségi meghatározáskor az extraktumban mért peszticidek koncentrációja ng/ml dimenzióban megegyezik a peszticidek bemért mintára vonatkoztatott koncentrációjával $\mu\text{g/kg}$ dimenzióban, ami azt jelenti, hogy 1 ml extraktum reprezentál 1 g bemért mintát. A továbbiakban ezt a módszert „eredeti QuEChERS”-nek nevezem. Lehotay és Anastassiades közös munkájukat ezután külön utakon tökéletesítették. Az „eredeti QuEChERS”-szel előkészített minták extraktumainak pH-ja nem volt szabályozott, aminek megoldásaként kifejlesztették az „acetát-pufferelt” [LEHOTAY; 2005] és a „citrát-pufferelt QuEChERS”-t [ANASTASSIADES, 2007].

A három alapvető QuEChERS változat folyamatábráját a **2. ábrán** szemléltetem.



2. ábra Alapvető QuEChERS minta-előkészítési technikák

A QuEChERS technikák megjelenése után azok számos alkalmazása és módosítása jelent meg a szakirodalomban melyeket a mátrixok széles skáláján és számos peszticiden alkalmaztak, ezért szükségesnek tartom - a teljesség igénye nélkül és nem feltétlen időrendi sorrendben -, bemutatni a fő alkalmazásokat és módosításokat.

Egy tanulmányban az „eredeti QuEChERS”-t alkalmazzák fejes káposzta és retek mintákon, melyben 107 peszticidet vizsgáltak GC-MS műszerrel a kiválasztott ion-monitorozás (SIM) módban [NGUYEN; 2008]. A célpeszticidekre megfelelő érzékenységet és kinyerési hatásfokot (80-115 %), valamint megfelelően alacsony meghatározási határt (LOQ) (0.001-0.03 mg/kg) érték el, ami jól mutatja az „eredeti QuEChERS” alkalmazhatóságát GC-vel jól mérhető komponensek nagy víztartalmú zöldségekből (mint a fejes saláta és a retek) való mérésére.

Nagy cukortartalmú mátrixokban: szőlőben, mustban és borban vizsgáltak huszonzét peszticidet GC-MS technikával SIM módban, az „eredeti QuEChERS” egy módosításával [CUNHA; 2009], amiben a mintatisztítási lépést változtatták meg. A zöldségekhez képest nagyobb cukortartalommal rendelkező szőlő és must, valamint a bor alkoholtartalma miatt az acetonitriles extraktumhoz milliliterenként eredetileg adagolt 25 mg PSA helyett 50 mg, míg plusz szorbensként ebben a módosításban 50 mg C₁₈ is került. A nem illékony mátrixkomponensek eltávolítása miatt szükséges ez, mert azok a GC injektor „liner” részében számos injektálás után felhalmozódva eltömíthetik azt. Megfelelő hatásfokkal (70-120 %) extrahálható a célkomponensek nagy része. Az alacsony kimutatási határértékei (1-19 ng/g) mutatják a módszer megfelelő érzékenységét.

Lesueur 140 peszticidet vizsgált szőlőben, citromban, paradicsomban és hagymában GC-MS és LC-MS technikával [LESUEUR; 2008]. A „citrát-pufferelt QuEChERS” egy módosítását alkalmazta, amiben csak a tisztítási lépést változtatta meg. Az eredetileg milliliterenkénti 150 mg MgSO₄ + 25 mg PSA + 7,5 mg GCB helyett 158 mg MgSO₄ + 25 mg PSA került, a GCB-t viszont elhagyta. A szerző 96 peszticidet GC-MS, 37 peszticidet LC-MS és 9 peszticidet mindkét technikával vizsgált a fent említett mátrixokban. Fontos még megjegyezni, hogy a gázkromatográfiás injektáláshoz az acetonitrilről a GC esetén jobban alkalmazható aceton/etil-acetát (1:1) elegyre váltott. A QuEChERS ezen változata az apoláros, közepesen poláros és poláros peszticidek extrahálására is alkalmas, mellyel átlagosan a GC-vel és LC-vel mérhető célpeszticidek 70 illetve 90 %-a extrahálható megfelelően (70-110 % kinyerési hatásfokkal) a vizsgált mátrixokból. A citrom (nagy savtartalom) és a hagyma (nagy kéntartalom) mátrix problémásnak bizonyult, mert ezzel a minta-előkészítéssel szisztematikusan alacsonyabb kinyerési hatásfok érhető el, mint a paradicsom és a szőlő esetében. A kimutatási (LOD) és mennyiségi meghatározás határai (LOQ) a vizsgált peszticidekre vonatkozó határértéket (MRL értékek a bio élelmiszerekre általánosan 10 µg/kg) gyakran meghaladták: ~1-50 és ~1-160 µg/kg a GC-vel mérhető, illetve ~1-115 és ~3-380 µg/kg az LC-vel mérhető peszticidek esetében. Ezért a szerző a

detektálási módszer tökéletesítését vagy további tisztítási, és/vagy koncentrálnálási lépést javasol az érzékenyebb detektálás eléréséhez.

Banerjee specializálta a QuEChERS módszert szőlő mátrixra olyannyira megváltoztatva ezzel a módszerhez használt vegyszereket, hogy ez a módszer csak az extrakció/megoszlást és a mintatisztítást, mint lépést örökölte az „eredeti QuEChERS”-től [BANERJEE, 2007]. Tanulmányában 82 peszticidet vizsgált szőlőben LC-MS/MS technikával. Bár az „eredeti QuEChERS” fejlesztésekor Anastassiades megvizsgálta az acetont és az etil-acetátot is, mint lehetséges extraháló oldószert, ő mégis az acetonitril mellett döntött annak HPLC-hez való jobb kompatibilitása miatt [ANASTASSIADES, 2003]. Úgy találta, hogy az etil-acetáttal jó kinyerési hatásfokot lehet elérni számos peszticidre zöltség és gyümölcs mintákból, ugyanakkor a kioldódó mátrixkomponens mennyisége kevesebb, mint acetonitril esetében. Az etil-acetát alkalmazható nagy cukortartalmú mátrixokra, mert a cukor oldódása az etil-acetátba korlátozott, ennél fogva a várható mátrix-okozta háttérzaj is kevesebb lesz. Banerjee ezért az etil-acetátot választotta extraháló szerként. Az extrakciós/megoszlási lépésben 10 g szőlőmintát, 10 ml etil-acetátot és 10 g vízmentes nátrium-szulfátot (Na_2SO_4), míg a tisztítási lépésben csak 25 mg PSA szorbenst alkalmaz az etil-acetátos felülúszóhoz milliliterenként. Az LC méréshez pedig az etil-acetátot metanol/víz (1:1) elegyre váltotta. Megfelelő kinyerési hatásfokot ért el a vizsgált peszticidek többségére, párhuzamot vonva az „eredeti QuEChERS”-szel azonban néhány különbség mindenképpen megfigyelhető. A poláros peszticidekre (methamidophos, acephate) szisztematikusan alacsonyabb a kinyerési hatásfok etil-acetáttal, mint acetonitrillel. Ennek oka az, hogy (i) a poláros peszticidek oldhatósága etil-acetátban általában korlátozott és (ii) az acetonitril vízzel való elegyítése sók jelenlétében egy termodinamikai folyamatot indít, melynek hatására az acetonitril nem elegyedik a vízzel és ennek következtében a poláros peszticidek az acetonitriles fázisba áramlanak, ami magasabb kinyerési hatásfokot eredményez. A kinyerési hatásfokot több dúsítási szinten (2.5; 5.0; 10.0; 25.0 és 50.0 $\mu\text{g/kg}$) vizsgálta, melyek megfelelőek voltak (70-110 %) már a 2.5 $\mu\text{g/kg}$ koncentrációban is, ami jól mutatja az LC-MS/MS technika érzékenységét.

Romero-González 90 peszticidet vizsgált gyümölcslevekben UHPLC-MS/MS technikával és a „acetát-pufferelt QuEChERS” módosítását alkalmazta, melyben egyszerűen elhagyta a tisztítási lépést és helyette az acetonitriles extraktumot vízzel 1:1 arányban hígította [ROMERO-GONZÁLEZ; 2008]. A mintatisztítás hiányának ellenére is 70-90 %-os kinyerési hatásfokot értek el 100 µg/l dúsítási szinten. Ez annak köszönhető elsősorban, hogy a gyümölcslevek analitikai értelemben alapvetően egyszerű mátrixok, továbbá a módszer magában foglalt egy kétszeres hígítást, ami nyilvánvalóan felére csökkenti a mátrix abszolút mennyiségét az extraktumban, ezért az általa okozott mátrixhatás is kisebb. A tisztítási lépés elhagyása bonyolultabb mátrixoknál nem ajánlatos, mert az oszlopra injektált (analitikai értelemben vett) nagy mátrixmennyiség az oszlop és az ionforrás bepiszkolódását és az érzékenység romlását okozhatja.

2.3.2.4 Extraháló oldószer

A legtöbb multikomponenses módszer valamilyen szerves oldószert, szerves oldószer keverékét, vagy vizet és valamilyen szerves oldószer keverékét használ. A kinyerési hatásfok nagyban függ az extraháló oldószer és a célpeszticid(ek) polaritásától. Apoláros peszticid(ek) (például a szerves klórtartalmúak) jól extrahálhatóak apoláros szénhidrogén oldószerekkel, míg a polárosabb peszticid(ek) (mint a szerves foszfortartalmúak) alacsony vagy közepes polaritású oldószereket igényelnek. Jóllehet, nem létezik olyan extrakciós-tisztítási kombináció, mellyel extrahálni lehetne minden peszticidet minden nyersanyagból, ami a multikomponenses módszereknek korlátokat szab. Az összes módszer összes komponensének 100 %-os kinyerése szintén valószínűtlen. Az utóbbi évtized publikációi megerősítik, hogy négy oldószer kiemelten fontos a multikomponenses módszereknél, ezek pedig az acetone, az acetonitril, az etil-acetát és a metanol. Az acetone, az acetonitril és a metanol teljesen, míg az etil-acetát csak korlátozottan vízzel oldható. Ez azért fontos, mert az acetone, acetonitriles és metanolos

extraktumok vizet is tartalmaznak, melynek eliminálása feltétlen szükséges minden gázkromatográfiás vizsgálathoz.

2.3.2.4.1 Acetonitril

Az acetonitril előnye az acetonhoz és az etil-acetáthoz képest, hogy polárosabb, ezért kevesebb lipofil komponens (olajok, klorofill, gyümölcsviasz) tud a peszticidekkel együtt extrahálódni. Hátránya azonban, hogy sokkal drágább és sokkal toxikusabb a fent említett másik kettőnél.

A Mills által 1963-ban publikált módszer [MILLS, 1963] egyike volt az első sokkomponenses módszereknek. Acetonitrilt használt szerves klórtartalmú peszticidek kinyerésére, számos zöldség és gyümölcsmintából. Ezeket a viszonylagos apoláros komponenseket, az acetonitrilhez adagolt víz, valamint telített sóoldat hozzáadásával petróleum éterbe rázatta át, majd a további tisztítást florisil oszlopon végezte. A meghatározáshoz gázkromatográfiát és elektronbefogásos detektort használt (GC-ECD). Az 1960-as évek végére a szerves foszfortartalmú peszticidek mezőgazdaságban való elterjedése azt eredményezte, hogy ezek a főként poláros komponensek is bekerüljenek a multikomponenses módszerekbe. Alternatív módszereket fejlesztettek ki, melyek meghagyták az acetonitrilt, mint extraháló szert, de más megoszlási oldószert vagy tisztítást alkalmaztak. 1971-ben Storherr [STORHERR, 1971] a petróleum étert diklór-metánra, a florisil tisztítást pedig savval kezelt aktív szénre cserélte, mellyel a szerves foszfortartalmú peszticidek széles skáláját tudta kinyerni zöldség és gyümölcsmintákból. Az 1990-es évek elejére már több mint 100 peszticid (köztük szerves klór és foszfortartalmú illetve karbamát peszticidek) extrakciójához is acetonitrilt használtak. Anastassiades és Lehotay 2003-ban megjelent publikációja az „eredeti QuEChERS” előkészítésről is acetonitrilt használ, ami széles körben elterjedt, számos módosítása jelent meg (2.3.2.3 fejezet), és „acetát-pufferelt” és „citrát-pufferelt” változatait (2. ábra) hivatalos módszerekké is nyilvánították (AOAC Official Method 2007.01 és European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15622).

2.3.2.4.2 Aceton

Az aceton a négy legjelentősebb oldószer közül a legkevésbé toxikus, a legolcsóbb és a legillékonyabb is. 1971-ben Becker [**BECKER, 1971**] acetont használt, mellyel növényi mintákból vont ki szerves klór és foszfortartalmú peszticideket. Luke 1975-ben fejlesztett módszerével [**LUKE, 1975**], mely szintén acetont alkalmaz, a fenti két csoporton kívül számos szerves nitrogéntartalmú növényvédőszerre is kiterjesztette. A módszer lényege, hogy az acetonos extrakciót követően a peszticideket petróleum-éter/diklórmetán elegybe rázatja át, melyet ugyanolyan florisil-es mintatisztítás követ, mint amelyet már Mills is használt [**MILLS, 1963**]. Luke továbbfejlesztette saját módszerét [**LUKE, 1981**], melyben a florisil tisztítás helyett petróleum-éter adagolásával távolította el a diklór-metánt. Ezzel egy időben Specht és Tillkes publikálták módszerüket [**SPECHT, 1980**], mellyel 90 peszticidet tudtak meghatározni növényi és állati termékekből. Luke-hoz hasonlóan ők is diklór-metánt használtak a peszticidek átrázására, de a mintatisztításra gélpermeációs kromatográfia szolgált. Módszerük német szabványmódszerré vált [**DFG method S-19**], melyet az 1980-as években és még az 1990-es évek elején is használtak Németországban és több európai országban. Az 1990-es évek elején kezdett egyre nagyobb nyomás nehezedni az analitikusokra, hogy a klórozott oldószeresek (mint a diklór-metán) használatát hagyják el. Koinecke [**KOINECKE, 1994**] számos nem-klórtartalmú oldószert megvizsgált és kutatása azt eredményezte, hogy ciklohexán, petróleum-éter és a butil-metil-éter is elfogadható kinyerési hatásfokokat eredményez. Specht [**SPECHT, 1995**] a német szabványmódszert (DFG method S-19) átdolgozta, melyben a diklór-metánt etil-acetát/ciklohexán (1:1) elegyre cserélte a módszer folyadék-folyadék megoszlási lépésében. Az utóbbi években is számos módszer alkalmaz acetont, mint extraháló oldószert.

2.3.2.4.3 Etil acetát

Míg az acetonitril, aceton és metanol teljesen, addig az etil-acetát csak kis mértékben elegyedik vízzel. A legnagyobb előnye, hogy az etil-acetátos minta alacsony víztartalma könnyen eliminálható kevés vízmentes só hozzáadásával. Összevetve a másik két oldószerrel, az etil-acetát kevésbé poláros, ezért olajos mintákból, mint az avokádó vagy az állati termékek, több apoláros lipofil anyag átkerülhet az extraktumba. Az első etil-acetátot használó módszer Watts publikálta 1969-ben [WATTS, 1969]. 60 szerves foszfortartalmú peszticidet határozott meg zöldségmintákból. Roos [ROOS, 1987] szintén etil-acetátot használt szerves klór- és foszfortartalmú peszticidek extrahálására. 1994-ben Fernández-Alba [FERNANDEZ-ALBA, 1994] pyretroidokat és szerves klórtartalmú peszticideket detektált GC-ECD és GC-MS technikával. Holstege az etil acetátba 5 % etanolt adagolt, mellyel elérte, hogy a legpolárosabb szerves foszfortartalmú peszticidek is kinyerje a zöldség és gyümölcsmintákból. Az etil-acetát használata ma is jelentős a peszticid analitikában.

2.3.2.4.4 Metanol

Metanol használata az előző háromhoz képest kisebb jelentőségű. A 2.3.2.2 fejezetben tárgyalt „Alder módszer”-en [KLEIN, 2003] kívül csak néhány módszer alkalmazza, melynek az oka az, hogy gyengébb eluens - emiatt gyengébben a képessége a peszticidek mátrixból való kivonására -, mint a gyakrabban használt acetonitril.

2.3.2.5 Mintatisztítás

Mivel a sokkomponenses módszerek célja minél több peszticid együttes meghatározása, ezért az extraháláskor a lehető legszélesebb kémiai tartományba tartozó molekulák kinyerését kívánja meg. Könnyen belátható, hogy ez akarva-akaratlanul is velük hasonló szerkezetű, de az analízis számára haszontalan, sőt sokszor - a detektálási technika szelektivitásától

függően - zavaró mátrixkomponenseket is kiold a mintából. Az extrakció után a mintatisztítás egy gyakori lépés, bár használata csak opcionális (**1. ábra**). A mintatisztítási lépés akkor hagyható el, ha fizikai módszerekkel (például centrifugálás, szűrés, fagyasztás) el lehet távolítani a mátrixkomponenseket az extraktumból, vagy ha oly mértékben lett a minta hígítva, hogy az nem okoz zavart a mérés során. Hígításkor azonban az analízis szempontjából fontos peszticidek koncentrációja is arányosan csökken, ami nyilvánvalóan nem kívánt következmény. Természetesen MS vagy MS/MS-nél szelektívebb detektálás (TOF-MS) alkalmazása is csökkenti a mintatisztítás szükségességét. A leggyakrabban használt sokkomponenses detektálási technikáknál (MS, MS/MS) maradv a azokhoz alkalmazott minta-előkészítési módszerek általában tartalmaznak mintatisztítási lépést. Mintatisztító anyagként mindig valamilyen szorbens anyag szolgál, gyakori a **PSA** (primary secondary amine=primer /szekunder amin), **C18**, **aminopropil**, **szilikagél** (florisil) és a **GCB** (graphitized carbon black=aktív szén).

Az „eredeti QuEChERS” tökéletlenségét az jelentette, hogy bár PSA-t használó „diszperzív SPE” mintatisztítás sok mátrixkomponenstől (mint a zsírsavak és más szerves savak) megszabadította a mintát, a leveles zöltségek extraktumából a jelentős mennyiségű klorofillt és szterolokat nem tudta eltávolítani. Ezek, bár a peszticidek mérését nem zavarják, a gázkromatográfiás mintabeviteli egység úgynevezett „liner” részének a belső felületén megkötődnek, felhalmozódnak és a „liner”-t gyakrabban kell cserélni. Az aktív szén abszorbens (GCB=graphitized carbon black), bár képes a klorofillt és a szterolokat megkötni, negatív mellékhatása azonban az, hogy a fontos peszticideket is visszatartja, ezért használata csak zöld növények előkészítésekor ajánlott szigorúan kis mennyiségben.

Michallangelo Anastassiades, az „eredeti QuEChERS” módszer egyik szerzője az „eredeti QuEChERS” tisztítási lépésben az acetonitriles felülúszóhoz milliliterenként 150 mg MgSO₄, 25 mg PSA és 7,5 mg GCB (graphitized carbon black=aktív szén szorbens) adagolt, mellyel megfelelő tisztítást ért el a nagy klorofill tartalmú minták extraktumaiban is. A GCB affinitása a klorofillra igen nagy, de mennyiségével vigyázni kell, mert a klorofill

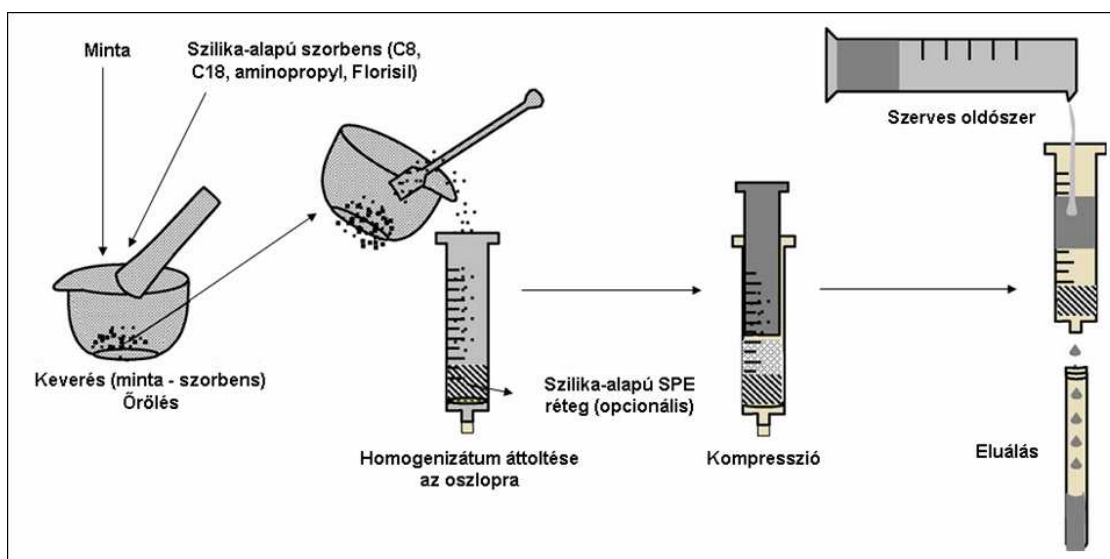
megkötése után planáris szerkezetű peszticideket is megköthet, ami ezek elvesztését jelenti a tisztítási lépés során [FERRER, 2005; GARCIA-REYES, 2007; CUNHA, 2010]. Ha a klorofill zavaró hatása nem érvényesül, mint például a szelektív detektálást alkalmazó LC-MS/MS technika esetében, akkor használata megkérdőjelezhető. GC-MS technikát alkalmazva azonban használata indokolt, főleg a kevésbé szelektív teljes pásztázás (full scan) módot alkalmazva.

A szerves fázisba oldódó lipofil mátrix-alkotók eltávolítására Fernández-Alba és munkatársai az „eredeti QuEChERS”-t mintatisztítási lépését úgy módosították, hogy PSA és MgSO₄ mellett C18 és GCB szorbenseket is adagoltak. Ezzel olyan mértékű tisztítást értek el olívaolaj mintákon, hogy az nem okozott kromatográfiás problémákat. Bár a kinyerési hatásfokot nem tesztelték, ezért nincs is információ arról, vajon a szorbensek nem kötik-e meg a célkomponenseket, a nagy tisztítási potenciál azonban egyértelmű [HERNANDO, 2007].

A fentiektől eltérő, de kétségtelenül jelentős extrakciós/tisztítási lehetőség a *mátrix szilárd fázisú diszperzió (MSPD)*, mely jellegében inkább a mintatisztításhoz, mintsem az extrakció témakörébe tartozik.

A makroporózus normál fázisú (például kovaföld) vagy fordított fázisú (például szilikagél) szorbenseket már régóta használják biológiai minták extrakciójához. A normál fázisú szorbensek a nagy aktív felületüknél fogva nagy mennyiségű vizet tudnak megkötni filmréteget képezve ezzel a felületükön, amivel így segítik az extrakciót és a megoszlást. A mátrix szilárd fázisú diszperzió (MSPD) elvét, mely normál fázisú szorbensek helyett fordított fázist használ, Barker publikálta az 1980-es évek végén [BARKER, 1989], mellyel egyszerűsítette a nagy zsírtartalmú minták minta-előkészítését. Ez egy nagyon egyszerű technika, ami nem igényel bonyolult és drága készülékeket, se nagy mennyiségű oldószert, ezért sokkal gazdaságosabb, mint jónéhány tradicionális módszer. Az MSPD során a kis mennyiségű mintát (0,1-2,0 g) vele ekvivalens vagy közel ekvivalens mennyiségű fordított fázisú szilika alapú szorbenssel keverik össze dörzsmozsárban, mely félszáraz, por alapú homogén mintát eredményez. Ezt egy oszlopba töltik

majd eluálják kevés (5-20 ml) szerves oldószerrel. Nagy zsírtartalmú minták előkészítésekor a lipidek filmréteggént vonják be a fordított fázisú szorbens aktív felületét, ami bár az extrakciót nem javítja, ellenben tisztítási lépésként funkcionál. A kis mintamennyiség előny lehet, ha a rendelkezésre álló mintamennyiség limitált (ez ritkán fordul elő élelmiszerminták esetén), azonban általában hátrány, mert ilyen kis mintamennyiség ritkán tudja reprezentálni a mintát, következésképpen homogenitási probléma léphet fel. Az MSPD mintamennyiségét azonban a szorbens ára limitálja és az tény, hogy a nagy szorbenságy a háttérnyomás emelkedését és a töltetes oszlop eltömődését okozhatja. Ezért 40 µm szemcseátmérőnél kisebb szorbens anyagok használata nem ajánlott. Az MSPD technikát elsősorban drogok és bomlástermékek, valamint toxikus szennyezők állati termékekből való vizsgálatához használták, de az utóbbi években rohamosan emelkedett a növényvédőszer analitikai jelentősége, ezért szükségesnek tartom ezzel bővebben foglalkozni. A minta szorbennsel való homogenizálása után annak egy üres oszlopba való töltése (MSPD) helyett egy már előre - szintén szilika alapú szorbennsel -, töltött oszlopra adagolják. Ez utóbbi tisztítási lépés a szilárd fázisú extrakció (SPE), melyet a peszticid analitikában gyakran alkalmaznak MSPD-hez csatoltan, de az SPE tisztítás, nem alapvető, csupán opcionális. Az MSPD (-SPE) technika általános folyamatát a **3. ábrán** szemléltetem.



3. ábra Mátrix szilárd fázisú diszperzió (MSPD) általános folyamatábrája

Soler 9 peszticidet vizsgált gyümölcsökben [SOLER, 2004] MSPD technikával és azt tapasztalta, hogy a kiválasztott komponensek jól kinyerhetőek és hogy a gyümölcsminta szimplán etil-acetátba való rázatásához képest az MSPD jelentősen csökkenti az együtt extrahálódó mátrixkomponenseket [SOLER, 2005]. A módszer hatékonyságát Ferrer tesztelte [FERRER, 2005] a gyümölcsöknél jóval problémásabb olivabogyó és olivaolaj mátrixokban. 12 peszticidet vizsgált GC-MS és LC-MS/MS technikával és megfelelő kinyerési hatásfokot tapasztalt olivabogyó mátrixból. Olivaolaj elemzésénél az MSPD előtt egy folyadék-folyadék extrakciós lépést kellett alkalmazni, de még ezzel is csak <60 % kinyerési hatásfok érhető el. Az viszont egyértelmű volt, hogy az MSPD lényegesen csökkenti az együtt extrahálódó mátrixkomponensek mennyiségét az addig nagy olajtartalmú mintákra széles körben alkalmazott géelpermeációs kromatográfiához képest.

A lehetőség adott volt, hogy az ekkor már jól ismert QuEChERS előkészítést összevegyék az MSPD alkalmazással. Lehotay tanulmánya [LEHOTAY, 2005] ezt állítja középpontba, és vizsgálatából kiderül, hogy a nagyon lipofil peszticidek kinyerésére az MSPD technika megfelelőbb, ellenben a QuEChERS a bázikus peszticidekre - amelyek MSPD-vel gyengén extrahálhatóak -, teljes kinyerést eredményez.

Kruve 14 peszticidet vizsgált zöldség és gyümölcs mintákból a Luke, a QuEChERS és MSPD módszerekkel [KRUEVE, 2008]. Míg a Luke és a QuEChERS megfelelő kinyerést biztosított, addig az MSPD bár csökkenti a mátrixhatást a másik kettőhöz képest, gyenge kinyerés érhető el vele. Ennek az oka az, hogy egyes peszticidek (carbendazim, imazalil, thiabendazole) a szorbens szabad szilanol csoportjain, irreverzibilis módon megkötődnek.

A módszert 266 peszticidre vizsgálva almalében LC-MS/MS technikával [CHU, 2005], megfelelő kinyerési hatásfokot értek el. Szorbensként a minta nagy víztartalma miatt kovaföldet használt. Az MSPD alkalmazása a nagy víztartalom miatt nem volt indokolt, amit alátámaszt az is, hogy nagyszámú peszticid kinyerésére a QuEChERS alapú módszerek tökéletesen megfelelnek. Romero-González ugyancsak gyümölcslevegekben vizsgált nagyszámú (90)

peszticidet [ROMERO-GONZÁLEZ, 2008] UHPLC-MS/MS technikával és a kinyerés tekintetében ugyanolyan megfelelőnek találta, mint Chu az MSPD technikát.

Bébiételek vizsgálatánál - ahol alapkövetelmény az alacsony kimutatási határ az alacsony határértékek miatt (10 µg/kg) az EU MRL minden növényvédőszerre) -, szintén csak akkor alkalmazandó az MSPD, ha azt a minta természete (nagy zsírtartalom) feltétlen megköveteli [HERCEGOVÁ, 2007].

A peszticid analitikában az MSPD technika előnyei más multikomponenses technikákhoz képest a következők:

- (i) az analitikai protokoll gyors és egyszerű
- (ii) az emulzió képződésének esélye kevés
- (iii) az oldószer- és anyagszükséglet jelentősen csökkentett, következésképpen a költség is
- (iv) a kinyerési hatásfok fokozottabb, mert az extraktum az egész bemért mintát reprezentálja.

Pozitívum, hogy szilárd és folyékony mintákra is alkalmazható. A fő hátrány azonban az automatizálás hiánya [GILBERT-LÓPEZ, 2009]. A közeljövőben az automatizálásával és direkt kapcsolásával analitikai rendszerekhez, gyakorlati jelentősége emelkedni fog [BOGIALLI, 2007].

2.3.2.6 Oldószerváltás

A sokkomponenses módszerek extrakciós lépésénél azt is figyelembe kell venni, hogy a minta oldószere megfelel-e a mérési rendszer kritériumainak. Ezért gyakran a már extrahált (és tisztított) mintán oldószert kell váltani.

Az eredeti QuEChERS módszer oldószere, az acetonitril, bár nem jelentett problémát GC-MS mérésnél kis mintamennyiség (1,5 µl) injektálásakor „splitless” módban [MASTOVSKÁ, 2004], mégsem ez az ideális oldószer a

gázkromatográfiás mérésekhez. Ennek az oka az, hogy az acetonitril elpárolgatása során nagyobb térfogatot igényel, zavart okoz a nitrogénre szelektív detektoroknál, és számos peszticid bomlását nem gátolja meg ellentétben a preferált aceton, hexán, izo-oktán vagy toluol oldószerekkel. Az acetonitriles extraktumból gázkromatográfiás méréshez jobban illeszkedő oldószerre való áttérés több kritériumot is támasztott. A laboratóriumok az érzékenység növelése érdekében szeretnék nagyobb, mint 1 mg bemért mintával ekvivalens mennyiségű mintát injektálni a GC-MS rendszerbe. Ez vagy nagy mintamennyiség injektálására alkalmas (LVI=Large Volume Injection) interfész használatát kívánja vagy az „eredeti QuEChERS”-szel előállított extraktumnál koncentráltabb minta bevitelét a GC-MS rendszerbe „splitless” módban. Mivel nem minden GC-MS készülék és ennél fogva nem minden labor van felszerelve LVI interfésszel, ezért a minta koncentrállása kézenfekvő megoldás. Egy előző tanulmány kimutatta, hogy a toluol a peszticidek stabilitása szempontjából a legelőnyösebb a gázkromatográfiás mintabevitelre [MASTOVSKÁ, 2004], ezért az acetonitriles extraktum ötszörös koncentrállása toluolba megfelelő megoldás. A toluolos extraktum így milliliterenként 5 g mintát reprezentál. 1 ml toluolos extraktum előállításához tehát 5 ml acetonitriles extraktum szükséges. Az „eredeti QuEChERS”-ben (2. ábra) a „diszperzív SPE” tisztítás után a tisztításra szánt extraktum körülbelül 50 %-a hasznosítható, ami azt jelenti, hogy 5 ml tisztított extraktum nyeréséhez 10 ml extraktumot kell „diszperzív SPE” tisztításnak alávetni. Ez azonban az „eredeti QuEChERS” mintamennyiségének növelését követeli meg, ezért a „acetát-pufferelt QuEChERS” az „eredeti QuEChERS”-hez képest 10 g minta, **10 ml acetonitril**, 4 g MgSO₄ és 1 g nátrium klorid **helyett** 15 g minta, **15 ml acetonitrilt** (+0,1 % hangyasav), 6 g MgSO₄ és 1,5 g nátrium acetátot **használ**. Ezzel a módosítással már alkalmas lett mind LC, mind GC alapú technikákhoz. Az „acetát-pufferelt QuEChERS” elterjedését és széles körű alkalmazását jelzi, hogy szabványos módszer lett: „*AOAC Official Method 2007.01*”.

2.3.2.7 Egyéb analitikai paraméterek

2.3.2.7.1 pH

Az extrakciós oldószer kémhatása nagymértékben befolyásolhatja a peszticidek bomlását és stabilitását. A zöldség és gyümölcsminták pH-ja széles tartományban mozog (<2-7). Néhány peszticid, főleg az észterek érzékenyek a kémhatásra és extrém pH esetén hidrolizálnak. A peszticidek az analitikai lépések során, mint a minta feldolgozás, minta-előkészítés, mintatisztítás vagy a műszeres analízis, degradálódhatnak. Gulvydis és Walters [Gulvydis, 1991] egy laboratóriumok közötti felmérést végeztek, melyben a peszticidek bomlását vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy a *phtalamide* peszticidek (captan, captafol és folpet) 70-90 %-ban elbomlottak a friss karfiolminták felületén darálás hatására. Carabias Martinez [CARABIAS MARTÍNEZ, 1996] tanulmánya is ezt erősíti, miszerint a fenti 3 peszticid a hidrolizálás hatására tűnik el eredeti formájában elsősorban nagy víztartalmú mintákban. A probléma kiküszöbölése a pH csökkentése helyett nagy aktív felülettel rendelkező abszorbens mintához való adagolása.

Néhány komponens gyengén bázikus vagy gyengén savas természetű. A minta pH-ja ezeknek a kinyerésére hatással lehet. Például a carbendazim ($pK_a=4.2$), imazalil ($pK_a=6.5$) és a thiabendazole ($pK_a=4.7$) gyengén bázikusak, ezért vizes közegben, alacsony pH mellett protonálódnak. A pH emelésével (pH 7,5-re) a carbendazim, imazalil és thiabendazole oldhatósága javul vízzoldható oldószerekben, ezért jobban extrahálhatóak nagy víztartalmú mintákból.

Az „eredeti QuEChERS” módszer (2. ábra) hatékonyságát mutatja Lehotay 2005-ben megjelent tanulmánya [LEHOTAY, 2005], amiben a módszert sikeresen alkalmazta több mint 200 peszticiden GC-MS és LC-MS/MS detektálást alkalmazva. A vizsgált komponensek többségére megfelelő kinyerési hatásfok (70-120 %) értékeket tapasztalt, a komponensek 90 %-a a 90-110 % tartományba esett tipikusan <10 % szórás mellett. Néhány kiugró esetet azonban tapasztalt. A viszonylag bázikus rovarölő szerre, a pymetrozine-ra csak alacsony kinyerési hatásfok érhető el a savas természetű narancs mátrixban. A lúgos környezetre érzékeny peszticidek - mint a captan,

folpet, dichlofluanid és a chlorothalonil -, bomlását figyelte meg főleg a nem savas mátrixokban, mint a saláta. A fenti peszticidek tulajdonságai az irodalomban már ismertek voltak, mérésekre speciális minta-előkészítéseket használtak korábban [ANGIONI, 2003; DI MUCCIO, 1993; GILVYDIS, 1991]. Lehotay következő tanulmánya [LEHOTAY, 2005], ami az „acetát-pufferelt QuEChERS” fejlesztését foglalja össze, részben a pH problémáival is foglalkozik. Peszticidek, melyek érzékenyek a bázikusságra (captan, folpet, dicofol, dichlofluanid, tolylfluanid és chlorothalonil) könnyebben bomlanak a pH emelkedésével. Úgy találták, hogy 0,1 V/V % hangyasav adagolása az extraháló acetonitrilhez biztosítja e komponensek stabilitását az acetonitriles extraktumban. A pH azonban nemcsak egyes peszticidek stabilitása miatt fontos, hanem hatással van a kinyerési hatásfokra is. Ennek egy jó példája a pymetrozine, mely a savas narancsmintából csak csekély mértékben (~25 %), míg a kevésbé savas salátából jól extrahálható (~80 %) az „eredeti QuEChERS” előkészítéssel. Túl savas közegben ugyanis a pymetrozine hidrolizál és kationos formában rosszabb hatásfokkal kerül át az analízis számára fontos acetonitriles fázisba. A pymetrozine számára optimális a pH 6-7, a pH 4-5 között még elfogadható a kinyerési hatásfok, de <pH 4 esetén nagymértékben romlik. Az előzőleg tárgyalt bázikusságra érzékeny peszticidek miatt azonban a pH 4-5 közötti puffereléssel való beállítása tűnik optimálisnak. Ennek legkézenfekvőbb módja a hangyasav ($pK_a=4,75$) - acetát só kombináció. A hangyasav biztonságos, olcsó, könnyen beszerezhető, míg a választott nátrium-acetát a hangyasav tipikus puffer sója. Az így létrejött „acetát pufferelt QuEChERS”-nek nevezett módszerben az „eredeti QuEChERS”-hez képest az acetonitrilhez 0,1 % hangyasav került, míg a mintához adagolt NaCl-ot nátrium-acetát váltotta fel (**2. ábra**). Ez a módszer a cikkben tanulmányozott 32 különböző kémiai tulajdonságú peszticidre szignifikánsan jobb, 100 %-hoz közeli kinyerési hatásfokokat eredményezett, mint az „eredeti QuEChERS”, azonban a chlorothalonil volt az egyetlen, mely ezzel a módszerrel is rossz kinyeréssel jellemezhető. Ezért a minta homogenizálása, előkészítése és analízise fokozott elővigyázatosságot igényel a chlorothalonil meghatározhatósága szempontjából [HILL, 2000].

Az „eredeti QuEChERS” módszer egyik szerzője, Michallangelo Anastassiades, az „acetát-pufferelt QuEChERS”-hez hasonló szintén pufferelt módszerre alakította azt, hogy stabilizálja a minták eltérő kémhatásából adódó pH-beli különbségeket. Az „eredeti QuEChERS” megoszlási lépésében a 4 g MgSO_4 és 1 g NaCl mellett 1 g vízmentes nátrium-citrát-dihidrátot ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) és 0,5 g nátrium-hidrogén-citrát szeszkvihidrátot ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \times 1.5\text{H}_2\text{O}$) adagolt. A savas mintákhoz, mint amilyen a citrom is, további 600 μl 5N NaOH oldatot mért, mellyel így az extrém savas minták extraktumai is állandó pH értéken tarthatóak. A pH az „acetát-pufferelt QuEChERS”-hez képest (pH 4,8) itt magasabb: pH 5,5.

Ezt a szerző „citrát-pufferelt QuEChERS”-nek nevezte el (**2. ábra**), később ez is sztenderd módszer lett: *„European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15622”*.

2.3.2.7.2 Sók használata az oldat víztelenítésére

Az etil-acetátos extraktumok nyomnyi víztartalmának kivonása szintén fontos a tisztítás vagy gázkromatográfiás mérés előtt. Erre a Na_2SO_4 és MgSO_4 megfelelőek. Míg a MgSO_4 monohidrátot és heptahidrátot, addig a Na_2SO_4 heptahidrátot és dekahidrátot képez, következésképpen a Na_2SO_4 jobb víztelenítő ágens [ANASTASSIADES, 2003].

2.3.2.7.3 Sók használata a folyadék-folyadék megoszlásban

A folyadék-folyadék megoszlás olyan nagy víztartalmú minták, mint a zöltségek vagy a gyümölcsök esetén használatos, ha azok vízzel elegyedő szerves oldószerrel (acetonitril, aceton, metanol) voltak extrahálva. A folyadék-folyadék megoszlási folyamat az általában vízhez jobban „kötődő” peszticideket a szerves oldószerbe transzportálja. A nagyon poláros komponensek vízfázisból szerves fázisba való transzportját az előzőleg már említett sók (NaCl , Na_2SO_4 , MgSO_4 , stb.) segítik. A só vízhez való kötődése

kiszorítja a poláros peszticideket és a vízzel elegyedő szerves fázisba taszítja azokat. Minél több sót oldunk a vízfázisban, a peszticid tartalom annál nagyobb hányada kerül át a szerves fázisban. A sók hatása nem kizárólag a peszticidekre, de minden más poláros komponensre is hatással van, ezért a sók adagolása csökkenti a folyadék-folyadék megoszlás tisztító hatását azzal, hogy növeli a szerves fázisba átkerült (zavaró) mátrixkomponensek mennyiségét. Az „eredeti QuEChERS” fejlesztése közben vizsgálták a különböző sók vízelvonó képességét, és arra a következtetésre jutottak, hogy MgSO_4 sokkal hatékonyabb a víz eltávolítására acetonnitriles extraktumokból, mint a Na_2SO_4 [ANASTASSIADES, 2003].

2.3.2.8 Egyedi, tipikusan nem sokkomponenses módszerek (SRMs=Single Residue Methods)

A sokkomponenses peszticid módszerek mellett természetesen egyedi módszerek fejlesztése is szükséges volt. Bár az extrakciós módszerek főként a multikomponenses peszticid meghatározást taglalják, mindenképpen szükségesnek érzem érintőlegesen áttekinteni, hogy egyes peszticidek miért nem kerülhetnek multikomponenses módszerekbe.

Egyrészt ha a peszticid vagy peszticid csoport kémiai szerkezete és tulajdonságai nem teszik lehetővé a multi-módszerekbe való integrálásukat, speciális kémiai körülményeket igényelnek a kinyerésükhöz, vagy egy élelmiszerbotrány kirobbanásával szükségessé válik olyan gyorsmódszer, mely egy komponenst egyféle mátrixban határoz meg. Ez utóbbi esetben a peszticid integrálható lenne multikomponenses módszerbe, de egy gyorsmódszer szükségessége indukálja az egyedi módszer létrehozását. Másrészt, ha a peszticid molekulamérete extrém nagy, akkor az egyedi módszer fejlesztését nem a kinyerhetőség korlátozottsága, hanem az eltérő detektálás indokolja. Az egyedi módszerek fejlesztésére az egyik Közöségi Referencia Laboratórium (EURL-SRM, Stuttgart, Németország) specializálódott.

A brómtartalmú (főleg metil-bromid) permetezőszereket talajfertőtlenítésre és betakarítás utáni szerként alkalmazzák. A bomlásukból keletkező bromid a talajban és a növényeken is megkötődik. A brómtartalmú peszticideket polipropilén-oxiddal derivatizálják, majd GC-ECD technikával teljes szervesetlen brómtartalmat határoznak meg [**internet 2**].

Nagyon poláros, QuEChERS technikákkal nem mérhető peszticidekre ($\log K_{ow} < -2$) - melyek a chlormequat, mepiquat, ethephon, fosethyl-Al, maleic acid hydrazide, daminozide, glyphosate és AMPA -, a QuEChERS esetén használt kisózás nem vezet eredményre, mert a poláros peszticidek nem vándorolnak a vizesből a szerves fázisba. Ezért a mintához hozzáadott vízzel segítik a poláros peszticidek vizes fázisba jutását, majd metanollal extrahálják és a kisózás alkalmazása nélkül a metanol-víz elegyet mérik [**internet 2**].

Savas peszticidek (~20 komponens) extrakciója lisztekből a „citrát-pufferelt QuEChERS” alapjain nyugszik. A savas peszticidek gyakran kovalensen kötődtek a mátrix egyes alkotóihoz, így azokat semleges vagy enyhén savas pH mellett nem lehet kivonni a mintából. Ezért a módszer egy plusz lúgos hidrolízist (NaOH-dal) és egy semlegesítési lépést (H_2SO_4) is tartalmaz [**internet 2**].

Az Abamectin (=Avermectin B1a + Avermectin B1b + Avermectin B1A,8,9-Z~) a peszticidek átlagos méretétől (200-500 Da) eltérően közel 900 Da méretű. A relatíve nagy molekula instabil, nagyon érzékeny a pH-ra, az ionforrás magas hőmérsékletére és mivel ammónium - addukttal ionizálható, az eluens puffer koncentrációjának is nagy szerepe van [**internet 2**].

Élelmiszerbotrányok miatt vált továbbá szükségessé olyan peszticidek egyedi módszerbe való mérése, mint a pentachlorophenol a 2007-ben kirobbant guargumi botrány miatt [**internet 2**], az amitraz és bomlástermékeinek mérése körtéből [**TOKMAN; 2009 és internet 2**], melyet a törökországi szennyezett körte robbantott ki, valamint a Kínából származó gombák jelentős nikotin tartalma.

2.3.5 Modern multikomponenses peszticid meghatározási módszerek: a mérés

A tömegszelektív detektorok (MSD) megjelenésével a multikomponenses módszerek új korszaka kezdődött. Már az 1980-as években is számos publikáció megjelent peszticidek GC-MS és LC-MS detektálásáról, azonban a műszerek számítástechnikai háttere nem tette lehetővé a sokkomponenses módszerek fejlesztését. A közlemények az ionizációs technikák fejlesztésére és a peszticidek különböző ionizációs körülmények közti viselkedésére fókuszáltak, tipikusan csak pár vagy pár tíz növényvédőszerre terjedtek ki. Az 1990-es évekre azonban a számítástechnikai háttér is megvolt, így kezdetét vette a modern peszticid analitika korszaka. Az alapvetően eltérő analitikai szisztéma miatt célszerűnek tartom a GC-hez, illetve az LC-hez köthető technikák külön való áttekintését.

2.3.5.1 GC alapú technikák

A gázkromatográfia nagy elválasztási képességgel rendelkező szeparációs technika. Élelmiszeranalitikában - így a peszticidek méréséhez is -, 10-30 m hosszú, 0,25-0,32 mm belső átmérőjű belső felületén filmréteggel bevont kapilláris oszlopokat használnak. Természetesen ennél szűkebb oszlopok is léteznek, de tipikusan azokat tiszta minták méréséhez alkalmazzák, ahol a komponensek teljes elválasztása feltétlen szükséges. A GC-hez kapcsolt MS technikák szelektivitása miatt azonban nem szükséges - sok esetben nem is lehetséges -, a mátrixtól való teljes elválasztás. A kromatogram hosszát nyilvánvalóan a GC oszlop paraméterei és a hőmérséklet gradiens, valamint a vivőgáz áramlási sebessége határozza meg. A peszticidek mérése szempontjából azonban a detektálás és a mintabevitel lényegesen fontosabb.

A mintabevitel jellemzően valamilyen illékony, szerves oldószerben történik, ami általában etil-acetát, hexán, ciklohexán, toluol vagy aceton. Bármilyen

szerves oldószert alkalmazó minta-előkészítésről legyen is szó, GC-s méréshez lehetőleg a fenti oldószerek egyikébe kell a mintamennyiséget juttatni. Lényeges, hogy a GC nem alkalmazható általánosan minden peszticidre. A komponensnek a minta injektálásakor alkalmazott nagy hő közlés miatt illékonynak és hőstabilnak kell lennie, ellenkező esetben az injektáláskor a linerben marad vagy az injektálás pillanatában elbomlik. A nem illékony és/vagy hőlabilis peszticidek mérésére az LC-hez kapcsolt technikák alkalmasak. Természetesen van egy határsáv is, olyan peszticidek, melyek mindkét technikával jól mérhetőek. Ilyen esetekben a rendelkezésre álló eszköz és az analitikus döntése határozza meg, hogy milyen elválasztást alkalmaz.

A mintabevitel attól függően, hogy a minta egy része vagy egésze jut-e a GC oszlopba, úgynevezett split és splitless injektálást különböztetünk meg. Az alacsonyabb kimutatási határok érdekében a peszticid analitikában is a lehetőleg nagy mennyiségű minta splitless módban való injektálása az előnyösebb. A nagy mennyiségű minta a konvencionális GC injektáláshoz (1-2 µl) képest jóval nagyobb, általában 10, extrém esetben akár 20 µl is lehet, melynek bejuttatását az LVI (Large Volume Injection = Nagytérfogatú Injektálás) interfész teszi lehetővé. A mintamennyiség meghatározása mindig egy kompromisszum eredménye kell, hogy legyen. Biológiai mintákról lévén szó, a bejuttatott mátrix mennyisége a mintamennyiséggel egyenesen arányos. A mátrix mennyiségét a mintában csökkenteni lehet minta-előkészítési tisztítási lépésekkel, azonban ennek az a veszélye, hogy az analitikus számára fontos peszticideket is elveszthetjük. A mátrix a peszticidekre gyakorolt hatása az injektor liner részében érvényesül és még egy sokféle szorbenst használó minta-előkészítési módszer esetén is >20 % mátrixhatás tapasztalható számos komponensre. A QuEChERS által is használt PSA önmagában is elegendő hogy jelentősen csökkentse a mátrixhatást [SCHENCK; 2000]. Tipikusan jelerősödés tapasztalható GC-s méréseknél a mátrix hatására, melynek logikus magyarázata a következő. Az injektor liner részében általában valamilyen szorbens anyag van, mely a mátrix egy részét leköti injektáláskor megakadályozva ezzel az oszlop elszennyeződését. Mátrixmentes sztenderd vagy sztenderd keverék oldat injektálásakor egyes

peszticidek ezeken a kötő helyeken képesek adszorbeálódni hidrogénkötést kialakítva az aktív helyekkel, ezáltal az oszlopra a liner-be juttatott peszticid abszolút mennyiségének csak egy hányada jut be. Ezzel szemben a mátrix-szal együtt injektálva, az aktív helyeken a mátrix egyes komponensei könnyebben megkötődnek, ami miatt a peszticidek nagyobb hányada juthat be, mint tiszta oldószer esetén. Következésképpen egy megnövekedett jel, pozitív mátrixhatás tapasztalható. Manapság a leggyakrabban az LVI-PTV injektálási módot alkalmazzák, ami nagy mennyiségű mintabevitelt (5-10 µl) és programozott hőmérsékletű elpárologtatást jelent. A PTV elve, hogy a bejuttatott mintát pillanatszerűen felhevítik, ez ennek hatására gáz halmazállapotúvá válik, kitágul, és a vivőgáz hatására az oszlopra jut, ahol a gradiens kezdeti alacsony hőmérsékletének hatására újra koncentrálnak az oszlop elején. Az egyes mátrixalkotók linerben való megkötődését a liner folyamatos fűtésével egy mellékcsatornán elvezetve eliminálják.

Az oszlopot elhagyó, már elválasztott komponenseket ionizálni és detektálni kell. Az ionizáció EI (egyes szerzők szerint Electron Impact=Elektron Ütköztetés, mások szerint Electron Ionization=Elektron Ionizáció) és pozitív vagy negatív CI (Chemical Ionization=Kémiai Ionizáció) lehet. Általában GC-MS-t (GC-ioncsapda MS, GC-TOFMS) és GC- tandem MS-t (GC-MS/MS) alkalmaznak. A kétdimenziós elválasztásra alkalmas GC×GC TOFMS alkalmazása a peszticid analitikában még annak kezdeti fázisában jár. Az EI ionizáció gyakoribb forma, mert robusztusabb, a keletkező spektrumok a műszergyártótól sem függenek, ezért könnyebb általános spektrumkönyvtár létrehozni. Ezzel szemben a CI kíméletesebb ionizáció, a keletkező spektrum általában szegényesebb, mint az EI spektrum, mert fragmensek ritkán keletkeznek. Sok tanulmány jelent meg az EI-GC-MS 250-400 peszticidre kiterjedő használatáról [**CAIRNS, 1993; FILLION, 2000; STAN, 2000; CHU, 2005**]. A kémiai ionizáció (CI) előnye, hogy a mátrix zavaró hatása kisebb, mint EI esetén [**HERNANDO, 2001**], de peszticidek széles skáláján a CI-vel elért intenzitások nagyobb diverzitást mutatnak, mint EI-vel, valamint a CI-vel elért tömegspektrumok kevesebb fragmenst tartalmaznak, mint EI esetében, ezért a kémiai információtartalma is kevesebb. CI-t elsősorban egyes peszticid csoportok mérésére alkalmaznak, mint a szerves

foszfortartalmú [RUSSO, 2002], szerves halogéntartalmú [CHALER, 1998] vagy piretroid [RAMESH, 2004] peszticidek. Lévéen egy nem univerzális technika, CI-t csak ritkán alkalmaznak sokkomponenses peszticid meghatározási módszereknél.

Az MS detektálás alapvetően történhet SIM (Selected Ion Monitoring=Kiválasztott Ion Monitorozás) és teljes pásztázás (full scan) módban. SIM módban MS esetén 2 vagy 3, a molekulára jellemző iont, MS/MS esetén pedig egy nagy intenzitású iont és az abból keletkező 2 vagy 3 fragmenst monitoroznak. A szelektívebb MS/MS detektálás miatt itt a kromatográfiás zavaró hatások csak mérsékelten jelentkeznek [GONCALVES, 2004]. Egyes műszerek ioncsapdával is fel vannak szerelve, melyekkel akumulálni lehet az ionokat, növelve ezzel az érzékenységet. A full scan mód folyamatos pásztázást biztosít, a kromatogramban levő információ pedig a belőle előhívható spektrumok összege. A spektrumok háttértől való tisztítását, illetve azonosítást az aktuális szoftver a rendelkezésre álló spektrumkönyvtárakból automatikusan végzi. A spektrumkönyvtárakban szereplő peszticidek száma az utóbbi években megnőtt, ezeket a National Institute of Standards (NIST) intézet rendszerezte/rendszerezi. GC-MS kapcsolással az azonosítás a spektrum, plusz a retenciós idők fixálása alapján is megoldható. Ezt Stein és munkatársai fejlesztették szintén a NIST intézetben, majd a Microsoft-tal közösen megalkották az AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) programot.

Bár full scan módra az MS és MS/MS detektálás is alkalmas, a TOFMS csak full scan módban működtethető. GC-TOFMS műszerek két alapvető full scan módban működhetnek: gyors pásztázással, de kis tömegpontossággal, amivel a koelválódó csúcsok tömegspektrometriásan szeparálhatóak [PATEL, 2004], vagy lassú pásztázással, de nagy, akár 0.02 Da tömegpontossággal [CAJKA, 2004]. Általában a TOF detektorok szűkebb koncentráció-tartományban tudnak lineáris összefüggést biztosítani a koncentráció-jel összefüggésben, mint az MS vagy MS/MS rendszerek [DALLUGE, 2002]. TOFMS detektort LC-hez kapcsoltan általában nagy tömegpontosság mérésére, míg GC-hez kapcsoltan gyors pásztázási sebessége miatt alkalmazzák.

Összehasonlításképpen, az MS full scan módban 10, míg a TOFMS 100 pásztázási periódust tud rögzíteni másodpercenként.

A mérés technika robusztussága valódi minták rutin méréséhez elvitathatatlan. A robusztusság csökkenése vagy romlása kevesebb mátrix-szal terhelt mintát, vagy kevesebb minta-mennyiség injektálását teszi csak lehetővé azonos idő alatt, ami limitálja az analitok detektálását és csökkenti a mintaszámot. Emellett a műszer felhasználói tisztítását is gyakrabban kell végezni. Míg a nem illékony mátrixkomponensek a liner-ben okoznak problémát, a (részben) illékonyak az analittal együtt kromatográfiás interferenciákat eredményeznek, ami ezért hatással van a kimutathatóságra is. Sok esetben tehát az analitikus feladata a mérlegelés: csökkenteni az injektált mátrix mennyiségét úgy, hogy a mérendő komponensek kimutatási határa még elfogadható legyen, és hogy a bejuttatott mátrix ne okozzon robusztusság romlást. 57 peszticidet vizsgáltak GC-MS-sel SIM módban nagy víztartalmú mátrixokban, ahol a 2-3 µl mintamennyiség splitless módban optimális volt a fenti szempontok tekintetében [MAŠTOVSKÁ, 2004].

A szakirodalomban gyakran minta-előkészítési módszerek optimálásához vagy összehasonlításához, mint alkalmazást írják le a GC mérés technikát. A közlemények túlnyomó többsége a zöldség és gyümölcsmintákat veszi célba, a prognosztizálhatóan nagy interferenciákat, zavaró hatásokat okozó mátrixokról (mint a fűszerek vagy a tea) azonban kevesebb szó esik.

Etil-acetátos extrakcióval zöldségekből kivont 10 reprezentatív peszticiden GC-MS (SIM) technikával az alapvető analitikai paraméterek teljesülése mellett nagy mátrixhatást tapasztaltak, aminek kompenzálására mátrix-illesztett kalibráció ajánlott [AGÜERA, 2000]. A GC-MS kapacitása SIM módban megfelelő 27 [CUNHA, 2009], 32 [LEHOTAY, 2005], 105 [LESUEUR, 2008], 107 [NGUYEN, 2008], illetve 144 [LEHOTAY, 2005] peszticid együttes mérésére is. Az MS/MS detektálás nagyobb szelektivitása miatt kevesebb zavaró interferencia tapasztalható, mint MS detektálás esetén, ami több komponens együttes mérését teszi lehetővé. 251 [FILLION, 2000], illetve 260 [OKIHASHI, 2007] peszticid szimultán mérését is publikálták, azonban ennél a nagyságrendnél jóval több komponens együttes mennyiségi

mérése technikai szempontból sem előnyös. A kalibrációhoz szükséges sztenderd keverék oldatok készítése nagyon időigényes, ráadásul egyes peszticidek a híg sztenderd oldatokban bomlanak, ami megköveteli az oldatok készítésének fokozott gyakoriságát. A 250-nél több komponens együttes mérésére egy alternatív megoldás a nagyszámú peszticid csak minőségi azonosítása. Mezcua elképzelése, hogy nagyszámú (>900) peszticidet határozzon meg minőségileg, majd a mintákban előfordulókat (~100) mennyiségileg is mérje [MEZCUA, 2009], véleményem szerint a mai sokkomponenses peszticid analitika egy meghatározó irányvonala. Módszerét GC-MS csatolással publikálta, az azonosítás alapjául pedig tömegspektrum és rögzített retenciós idő szolgál. A full scan módban felvett GC-MS kromatogramok háttértől való automatikus megtisztításához és kiértékeléséhez AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) programot használt. Módszertől, komponenstől és mátrixtól függően a fent említettek mindegyike kisebb-nagyobb mátrixhatásról számol be. A mátrix linerben okozott negatív hatása azonban kiküszöbölhető analit-védő anyagokkal. Ezek ugyanúgy működnek, mint maga a mátrix: a linerben az aktív helyekhez kötődnek hidrogénkötéssel, kiszorítva ezzel a peszticideket és a mátrixkomponenseket. Az ideális analit-védő anyagok fő tulajdonságai:

- (i) sem az oldatban, sem a GC rendszerben nem reagálnak az analittal és nem okoznak degradációt;
- (ii) nem rongálják a detektort vagy a GC oszlopot;
- (iii) nincs zavaró hatásuk a detektálásban;
- (iv) nem rakódnak le a GC injektorban vagy egyéb helyeken;
- (v) széles körben elérhetőek, olcsók és nem veszélyesek;
- (vi) oldhatóak az aktuális oldószerben.

A QuEChERS-alapú minta-előkészítés, pontosabban a PSA használata elsősorban szerves savakat (fenolos és zsírsavak) és szénhidrátokat (mint a fruktóz) vonja ki a mintából. A PSA első és másodrendű amino-csoportokat tartalmaz, ami képes hidrogén és ionos kötésre, ezért pont a hidrogénkötésre hajlamos mátrixkomponenseket eliminálja a mintából. Ezért az analit-védő

anyagoknak sok hidroxi és/vagy amino csoporttal kell rendelkezniük, hogy hidrogénkötést tudjanak létesíteni a liner aktív kötőhelyeivel **[ANASTASSIADES, 2003]**. Egy ehhez kapcsolódó tanulmány szerint az etilglicerol:gulonolakton:szorbitol 10:1:1 mg/ml koncentrációjú és arányú keveréke a mintában optimális az analitok védelmére. Hatása az egész elúciós tartományra kiterjed, csökkenti a mátrix miatt fellépő kalibrációs problémákat, csökkenti a nem illékony mátrixkomponensek lerakódását a GC rendszerben és növeli a robusztusságot, ezáltal csökkenteni lehet a karbantartás gyakoriságát. Analit-védő szerek használata azonban nem mindenhol bevett gyakorlat, mely főleg abból ered, hogy összeállítása és mintához adagolása plusz labormunkát igényel és sok esetben - főleg jól tisztított és/vagy nagy víztartalmú mátrixok esetében -, felesleges is az alkalmazása.

Az elválasztás hatékonyságának növelése, így a koelúciós zavaró hatások csökkentése kétdimenziós elválasztással oldható meg. Az elméletet, miszerint két, egymástól eltérő polaritású oszlopot kell sorba kapcsolni, majd az első oszlopról eluálódó egydimenziós kromatogramot modulálni kell, ami a második oszlopról eluálódva kétdimenziós elválasztást eredményez, már közel húsz éve Phillips és munkatársai publikálták **[LIU, 1991]**.

Elválasztási potenciálja olyan mátrixok (illetve extraktumok) mérésénél lényeges, melyek valóban bonyolultak. Szénhidrogének, parfümök mérésére alkalmazzák elsősorban **[ADAHCHOUR, Part III, 2006]**, azonban élelmiszerminták méréséhez is nagy potenciállal rendelkező technika **[ADAHCHOUR, Part IV, 2006]**. Banerjee szőlőből **[BANERJEE, 2008]**, Chen rizsből és halolajból **[CHEN, 2007]** mért peszticideket ezzel a technikával. Ezek mellett persze sok más alkalmazást és módszert publikáltak peszticidek mérésére olyan mátrixokból, ahol a kétdimenziós elválasztás alkalmazását nem feltétlenül indokolta volna a mátrix háttér **[CUNHA, 2009; HERRERO, 2009]**.

A peszticidek mérése fűszerekben nem túl hangsúlyos téma. Ennek nyilvánvaló oka az, hogy fogyasztási mennyiségük lényegesen kisebb, mint a zöldségeknek, vagy gyümölcsöknek. Lévén száraz termék, a peszticidek,

melyekkel esetlegesen kezelték a fűszernövényt, a szárítás hatására feldúsulhatnak, ezért veszélyforrást jelentenek a fogyasztók számára. Néhány publikáció foglalkozik csak fűszerek mérésével, és ezek is csak egydimenziós gázkromatográfiát alkalmaznak [MANIRAKIZA, 2000]. A fűszerekben az aromakomponensek, zsírsavak, színanyagok és pigmentek koncentráltan vannak jelen, ami mindenképpen nagy háttérrel és koelválódó mátrixkomponenseket prognosztizál. A kétdimenziós GC a nagy szeparációs potenciálja miatt pedig alkalmas lenne peszticidek az ilyen bonyolult mátrixoktól való szeparálására. Ilyen típusú kutatást azonban eddig ismereteim szerint nem publikáltak.

2.3.5.2 LC alapú technikák

Folyadékkromatográfiát sokkal ritkábban használtak a múltban, míg azokhoz UV, diódasoros (DAD) vagy fluorescens detektor volt csak elérhető, mert azok kevésbé voltak szelektívek és érzékenyek, mint a velük egy időben alkalmazott GC technikák. Az MS, mint detektálási forma ekkor már létezett, de a minta MS-be juttatása nem volt megoldott. Az MS-be juttatott molekuláknak töltéssel kell rendelkezniük (úgynevezett kvázi-molekulaionok), hogy az elektromágneses térben repülni tudjanak, ehhez azonban a GC-nél alkalmazott EI és CI ionizáció nem volt megfelelő az LC-vel elválasztott hőre érzékeny molekulák és a mobil fázis folyadék volta miatt sem. A lágy ionizációs technikák megjelenésével azonban ez az akadály is elhárult.

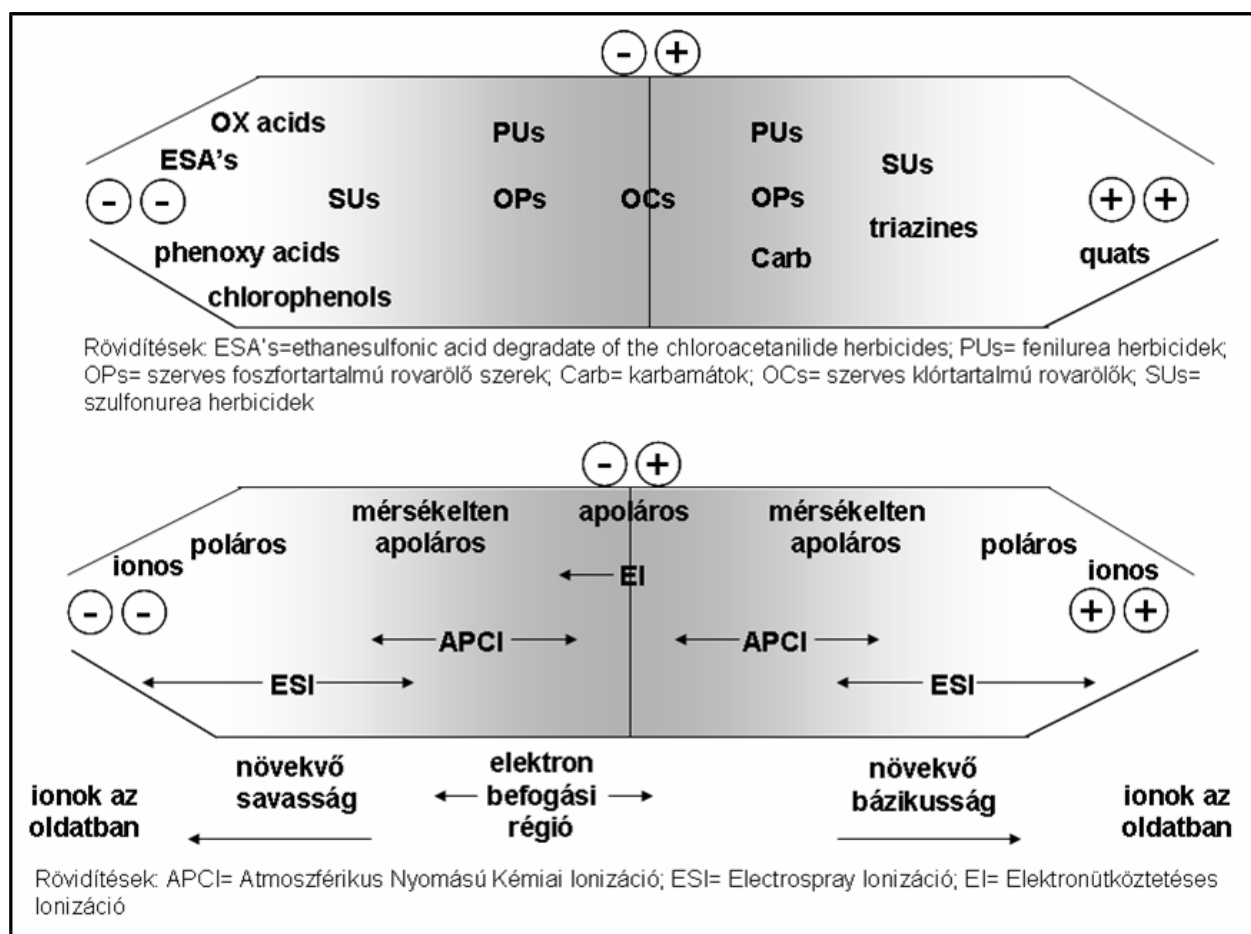
Az alábbiakban kísérletet teszek az LC/MS módszerek három nagy logikai egységének (elválasztás – ionizáció - detektálás) külön való tárgyalására fókuszálva a peszticid analitikai alkalmazásokra.

2.3.5.2.1 Elválasztás

A peszticid analitikában az elválasztás paraméterei tág határok közt mozognak, melyek megválasztását általában a célkomponensek száma határozza meg. Fordított fázisú oszlopokat használnak, hosszuk általában 5-30 cm, belső átmérőjük 3,5 - 5 mm, a szemcsenagyság pedig 2,1 - 5 μ m között alakul. Az alkalmazott eluens acetonitril vagy metanol, valamint víz és ezek keverékei, az elválasztáshoz szerves oldószer gradienst használnak. Az eluenshez gyakran adagolnak kis mennyiségben valamilyen módosítószert, mellyel az ionizáció hatásfokát növelik. A módosítószerekkel a következő részben (2.3.5.2.2 fejezetben) részletesen foglalkozok. Az elválasztástechnika területén az utóbbi 5 évben miniatürizálás és hatékonyságnövelési tendencia figyelhető meg. Ez az Ultra Nagy Hatékonyságú Folyadékkromatográfia (UHPLC) irányába mutat, mellyel az oszlophosszt 2-10 cm-re, a belső átmérőt 2,1 – 3,5 mm-re és a szemcseméretet 1,7 – 2,1 μ m-re csökkentették. Ezzel keskenyebb csúcsok, jobb szeparáció, rövidebb kromatogramok, egyszóval nagyobb hatékonyság érhető el. Az UHPLC oszlopok nyomásállósága a normál HPLC oszlopokéhoz képest (maximum 150-400 bar) jelentősen nagyobb, maximálisan 600-1200 bar is lehet, amit az elterjedtebb HPLC pumpák nem tudnak kiszolgálni, mert azok csak maximum 400 bar nyomást tudnak biztosítani. Következésképpen UHPLC elválasztáshoz UHPLC pumpát kell alkalmazni, ha 400 bar-nál nagyobb nyomáson akarjuk azt üzemeltetni. Számos UHPLC alkalmazást publikáltak, ennek ellenére azonban a rutin peszticid analitikában még nem vette át a HPLC szerepét, melynek oka hogy az UHPLC oszlopok gyakrabban eltömődnek a jelen mintaelőkészítési technikákkal tisztított növényminták mátrix komponenseitől, a nagyon nagyszámú peszticidet a futtatási idő nagyarányú csökkentése mellett pedig detektálás-technikailag is nehéz kivitelezni. A detektálás limitációjával később foglalkozok. A mai HPLC rendszerek oszlopmelegítési funkcióval (hőmérséklet-szabályozással) is rendelkeznek, néhány alkalmazás stabil - a szobahőmérsékletnél magasabb (30-50 °C) - hőmérsékleten tartja az oszlopot futtatás közben, egyesek pedig nem szabályozzák a hőmérsékletet. Azt, hogy az oszlop hőmérsékletének milyen hatása van a mérésre, még nem vizsgálták.

2.3.5.2.2 Ionizáció

Az atmoszférikus nyomású lágyszó ionizációs technikák (API) három típusa ismeretes: Atmoszférikus Nyomású Kémiai Ionizációs (APCI), Elektroporlasztásos Ionizációt (ESI) és Atmoszférikus Nyomású Foto Ionizáció (APPI). Az APPI használata ritka a sokkomponensű peszticid analitikában [TAKINO, 2003]. Lágyszó ionizációt (főleg APCI és ESI) MS detektálással alkalmazva, több nagyságrendnyi érzékenység javulás volt tapasztalható az annak előtte használt UV, DAD vagy fluoreszcencia detektáláshoz képest [ALDER, 2006] és természetesen nagyobb szelektivitást is biztosít. Thurman egy átfogó tanulmányt publikált az APCI és az ESI ionforrások hatékonyságáról, melyet 75 peszticiden tesztelt, ami 10 kémiai csoportot reprezentált [THURMAN, 2001]. Eredményeit a 4. ábrán prezentált ionizációs folytonossági diagramon összegezte.



4. ábra Ionizációs folytonossági diagram [THURMAN, 2001]

A szerves klórtartalmú peszticidek apoláros voltak miatt csak GC technikákkal mérhetőek. Attól függően, hogy pozitív vagy negatív módban használjuk a forrásokat: pozitív vagy negatív ionizáció történik; pozitív vagy negatív ionok jönnek létre. A nem ionos bázikus peszticidekre az APCI+ sokkal érzékenyebb, mint az ESI+, az ESI+ pedig az eleve pozitív töltéssel rendelkező peszticidekre, a bipyridylum herbicidekre (quat-ok: chlormequat, diquat, stb.) érzékenyebb. A savas peszticideket sokkal könnyebb negatív módban ionizálni (könnyebben vesznek fel negatív töltésű iont, mint protont). Az alkalmazott ESI- ionizáció 10-100-szor érzékenyebb, mint az APCI-. Az APCI+ sokkal érzékenyebb a triazin és fenilurea típusú peszticidekre, amik gyengén bázikusak és az oldatban nem rendelkeznek töltéssel. Az ESI- érzékenyebb, mint az APCI- a klorofenoxi-savas herbicidekre, alkilszulfátokra és acetanilid herbicid metabolitokra, amik egyébként anionos formában vannak jelen az oldatban is. A szerves foszfortartalmú és karbamát peszticidek ugyanolyan hatékonyak APCI+ és ESI+ ionizációt alkalmazva. Ezek a komponensek nitrogén vagy oxigén atomot tartalmaznak, melyeknek nagy a proton-affinitásuk. Egyszóval, az ESI hatékonyabban ionizálja az ionos és poláros peszticideket savas és bázikus közegben is. Az APCI poláros és apoláros peszticideket is ionizál, de az ionos komponenseket nem tudja gerjeszteni. Továbbá az APCI és az EI ionizáció a **4. ábra** közepén elhelyezkedő peszticideket képes ionizálni, mint a karbamátok és a szerves foszfortartalmú peszticidek. Következésképpen az APCI természetében közelebb áll az EI-hez, mint az ESI ionizáció. Fontos ezen kívül megjegyezni, hogy az LC-vel mérhető peszticidek nagy hányada pozitív ionizációra hajlamosabb, ezért a két ionizációs technika pozitív módban való alkalmazása került előtérbe a sokkomponenses peszticid módszereknel. Ha egy komponens jól ionizálható APCI+ módban, akkor jól működik ESI+-ban is, de visszafelé ez nem feltétlen igaz. Ezért a kettő közül az ESI+ hatékonyabb az általa úgymond lefedett peszticidek számának tekintetében az APCI+-hoz képest, következésképp univerzálisabb technika [THURMAN, 2001; KLEIN, 2003; JANSSEN, 2004; HERNANDEZ, 2005]. Thurman publikációjában savas mozgó fázis (0.1 % ecetsav vagy hangyasav) használatát ajánlotta ESI forrásokhoz, mert az segíti az ionizációt [THURMAN, 2001]. Azóta számos publikáció jelent meg, mely hangyasavat (0,05-0,2 %), ammónium formiátot

(5-20 mM) vagy ammónium acetátot (5-20 mM) használ ionizációt segítő szerként. Az ammónia tartalmú módosítók esetén nem csak hidrogén ($[M+H]^+$), hanem ammóniumion adduktok ($[M+NH_4]^+$) is keletkezhetnek. Mindhárom hatékonynak tűnik, azonban azt, hogy a sokkomponenses módszerek szempontjából melyik a leghatékonyabb, illetve hogy vannak-e esetleg negatív hatásai egyes peszticidekre vagy peszticid csoportokra nézve még nem tárgyalták.

2.3.5.2.3 Detektálás

Mára az LC-hez többféle MS detektor illeszthető, úgy, mint az egyedi quadrupole (MS), a quadrupol ioncsapda (QIT), a hármas (vagy tandem) quadrupol (QqQ=MS/MS), a repülési idő (TOF MS) vagy a hibrid quadrupol-repülési idő (QqTOF) tömeg spektrométer. A gyakran alkalmazott GC-MS analógiájára, az LC-MS technikát (és a quadrupol ioncsapdát) SIM módban ritkán alkalmazzák, a háttérben zavaró mátrix és oldószer klaszterek miatt. A valódi minták kémiai zavarása miatt nagyon rossz kimutatási határ érhető csak el, holott az MS detektor érzékenysége ennél jóval többre lenne képes [HERNANDEZ, 2005]. A kémiai háttér nagymértékben csökkenthető, ha tandem MS-t alkalmazunk Kiválasztott Reakció Monitorozás (Selected Reaction Monitoring=SRM) módban úgynevezett átmenetet, más néven tranzíciót monitorozunk. Ez a kvázi-molekulaion és a belőle keletkező fragmens ion(ok) monitorozását jelenti, ami nagyobb specifitást biztosít, mert a molekulával együtt eluálódó mátrixkomponens(ek)nek még ha ugyanaz is a tömege, az ütközési cellában belőle keletkező fragmens csak nagyon ritkán ugyanaz. Maradva a tandem tömeg spektrométernél, mely a mai sokkomponenses peszticid analitika leghatékonyabb detektálási eszköze, kalkulálható a meghatározandó célkomponensek maximális száma. A mennyiségi meghatározáshoz egy célkomponensnek két átmenetét kell pásztázni, melyből az intenzívebb a mennyiségi meghatározás alapja, a kisebb intenzitású pedig a minőségi azonosítás biztosítója. A két átmenet aránya a kalibrációban és a mintában is kisebb-nagyobb eltéréssel meg kell, hogy egyezzen [internet 6]. A nagyobb eltérés mátrix interferenciából vagy

alacsony analit-koncentrációból fakadhat. A tandem MS műszerek pásztázási sebessége 5-100 ezredmásodperc (továbbiakban msec) (az újgenerációs készülékek 1 msec-ot is tudnak), melynek megválasztása fontos a módszerbe foglalható komponensek számának tekintetében. A folyadékkromatográfiás csúcsok szélessége általában 0,4-1 perc és egy csúcs megfelelő definiálásához minimum 9 pontra van szükség. Egy keskenyebb csúcs meghatározásához (24 másodperc) maximum 2,5 másodperc lehet egy pásztázási ciklus, ha minimum 9 pontot kívánunk mérni. Ha egy átmenetet 20 msec-ig pásztázunk, a ciklusidő 125 átmenet pásztázását teszi lehetővé. Egy időablakba tehát ilyen feltételek mellett 125 átmenetet lehet foglalni. Ha a futtatást 5 időablakra bontjuk, az összesen 625 átmenetet engedélyez. Mivel minden komponens két átmenetét pásztázzuk, ez elméletileg 312 peszticid együttes mérését teszi lehetővé [ALDER, 2006]. Ez az elméleti szám azonban azért nem teljesül ilyen feltételek mellett, mert a sokkomponenses módszerek folyadékkromatogramján a csúcsok eloszlása nem egyenletes, több komponens eluálódik a kromatogram középső részén, mint az elején. Egyes esetekben a műszergyártók is határokat szabnak. Az Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS széria például szoftveresen 100-ra limitálja az egy időablakba foglalható átmenetek számát - így 50-nél több komponens együttes méréséhez mindenképpen minimum két időablakra kell bontani a módszert -, míg például az Applied Biosystems 3200 QTRAP készülék 300 átmenet együttes mérését engedélyezi érzékenységromlás nélkül. Módszerfejlesztéseknél természetesen átmenetek monitorozása közti szünetelési idővel is kalkulálni kell, ami gyártótól függően 1-5 msec. Természetesen, ha 300 átmenetet pásztázunk egyszerre, akkor a pásztázási időt a lehető legalacsonyabbra kell szorítani (5 msec/átmenet), hogy a meghatározás kromatográfiás információvesztés nélkül történjen. A gyors pásztázás azonban érzékenység romlással jár, így a kimutathatóságot alsó határát befolyásolja. Az UHPLC technikával elérhető kromatográfiás csúcsok keskenyebbek, tipikusan 0,1-0,5 perc szélesek, és ha egy keskeny 9 másodperc (=0,15 perc) széles csúcsot veszünk alapul, akkor az Alder által levezetett elmélet szerint 125 peszticid együttes mérése lehetséges egyszerre. Ez a szám természetesen nagyobb, ha kisebb pásztázási sebességet alkalmazunk. Új fejlesztésű tandem MS készülékekben a pásztázási időt az addigi 5 msec-ről 2 msec-ra (Applied Biosystems 5500

QTRAP), illetve 1 msec-ra (Shimadzu LCMS-8030) szorították, amivel a módszerbe foglalható komponensek száma növelhető és a közeljövőben a gyors készülékek tudják majd biztosítani a sokkomponenses módszerek UHPLC alkalmazásinak nagyobb térnyerését. Nyilvánvaló tehát, hogy az egy módszerbe foglalható peszticidek száma nemcsak minta-előkészítés, de műszer oldalról is limitálva van. Az analitikus feladata pedig hogy a rendelkezésre álló technikákat költséghatékonyan használja ki a határig feszítve a műszer adta lehetőségeket úgy, hogy közben elegendő analitikai információ álljon rendelkezésre a meghatározáshoz az 1-1000 µg/kg (ng/ml) koncentráció tartományban.

Az LC-hez kapcsolt TOF technikák (LC-TOF, LC-QqTOF) és a Fourier transzformáció elvén működő ioncsapdák (FT-LIT MS; Orbitrap) előnye a nagy tömegpontosság (<5 ppm) miatti szerkezetazonosítási képesség. Sokkomponenses peszticid módszerré való alkalmazásuk a mennyiségi méréshez fontos szűk lineáris tartományuk miatt kevésbé alkalmas, mint a tandem MS. A pontos tömegmérésen alapuló adatbázis létrehozásával azonban hatékonyak nagyszámú peszticid egy méréssel történő azonosítására [FERNÁNDEZ-ALBA, 2008].

2.3.6 Modern multikomponenses peszticid meghatározási módszerek: minőségbiztosítás

2.3.6.1 Szabályozás

A SANCO/10684/2009 [internet 6] dokumentum minden analitikai paraméterre aprólékosan kiterjedve szabályozza a méréstechnikát. Ezek közül a legfontosabbakat emelem csak ki.

Egy komponens azonosítására - lévén szó kromatográfián alapuló technikákról -, a retenciós idő mellett a következőknek kell teljesülniük:

- normál felbontású MS esetén minimum 3 jellemző ion (lehetőleg kvázi-molekulaionnal együtt)
- nagy felbontású és/vagy nagy tömegpontosságú MS esetén minimum 2 jellemző ion (lehetőleg kvázi-molekulaionnal együtt) vagy <5 ppm felbontóképesség mellett minimum 1 fragmens ion
- MS/MS detektálás mellett minimum 2 fragmens ion (átmenet) pásztázása és együttes jelenléte.

A detektált ionok arányának, melyet mindig a legintenzívebb, úgynevezett báziscsúcsához viszonyítanak (vagy MS/MS detektálás esetén az intenzívebb átmenethez), döntő szerepe van. A mintában detektált és a mátrixra illesztett kalibrációban a komponensre kapott ion-aránynak meg kell egyeznie, természetesen bizonyos mértékű toleranciával. Ezt a tűrési intervallumot a SANCO rendelet határozza meg és a bázis ionhoz viszonyított arányától teszi függővé. Az értékeket a rendeletből adoptálva az **1. táblázatban** teszem közzé.

1. táblázat Relatív ion intenzitások ajánlott maximum tűrési határai spektrometriás technikák esetén [SANCO/10684/2009].

Relatív intenzitás (a báziscsúcs %-a)	EI-GC-MS (relatív)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ (relatív)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
20 % - 50 %	± 15 %	± 25 %
10 % - 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Egy extrakciós módszer fontos jellemzője a kinyerési határfok. Könnyen belátható hogy nagyszámú peszticidet vizsgálva nehéz mindegyiket 100 %-ban kinyerni a mintából. Ezért a rendelet a kinyerési határfokot 70-120 % tartományban határozza meg. A minta-előkészítés validálását a célmátrixokra csoportonként legalább egy reprezentatív mátrixon kell elvégezni (a SANCO rendelet a mátrix csoportokat is összefoglalja) és a laboron belüli ismételhetőség (RSD_{wL}) <20 % kell, hogy legyen. Ha a vizsgált peszticid kinyerési határfoka a fenti intervallumba esik, akkor nem kell kinyerési faktorról kalkulálni. Ha viszont ezen intervallumon kívüli érték (tipikusan <70 %), és a párhuzamos eredmények szórása kicsi (RSD_{wL} <20 %), akkor az

is elfogadható. Ilyen esetekben viszont kötelező számolni a kinyerési faktoral.

2.3.6.2 Mátrixhatás

Legyen szó bármilyen minta-előkészítésről, sok peszticid együttes meghatározásához kíméletesnek és hatékornynak kell lennie, hogy a keresett (vagy nem keresett) komponensek minél nagyobb hányadát kivonja a mintából úgy, hogy azok ne alakuljanak át vagy degradálódjanak. Könnyen belátható, hogy a kíméletes extrakció-tisztítás után az extraktumba nem csak a keresett komponensek, de a mátrix egyes elemei, komponensei is óhatatlanul bekerülnek. Ezek a jel intenzitásában nem várt növekedést vagy csökkenést okozhatnak, legyen szó GC vagy LC alapú technikáról. Míg a GC technikáknál a hatás okairól a fenti fejezetben már szó volt, addig az LC-hez kapcsolódó mátrixhatásnak más okai vannak. A mátrixkomponensei koeluálódnak a célpeszticidekkel az oszlopról és így az ionforrásban is együttesen vannak jelen. ESI+ módban a jelen levő pozitív töltések - általában hidrogén ionok ($[H]^+$) - egy részét lekötik a nagy felületi aktivitással rendelkező mátrixkomponensek. Emiatt a célpeszticidek abszolút mennyiségének csak egy hányada tud ionizálódni. Ilyen esetekben mátrix okozta jelcsökkenés, úgynevezett szuppresszió tapasztalható. Akkor is szuppresszió tapasztalható, ha a mátrixkomponensek nem a töltést foglalják el a célpeszticidtől, hanem magával a már ionizált töltéssel rendelkező peszticiddel - úgynevezett kvázi-molekulaionnal -, alkotnak ion párt. Ha a koeluálódó mátrixkomponens hidrogén donor természetű, tehát plusz pozitív ionokat juttat a rendszerbe, akkor a hatás pozitív, jelerősödés figyelhető meg a mátrix nélküli sztenderd oldatokra kapott jelintenzitáshoz képest [NIESSEN, 2005]. Ez természetesen csak akkor következhet be, ha tiszta oldószerben a peszticidek abszolút mennyiségének is csak egy hányada ionizálódik. Hogy tiszta oldószerben ez a hányad mekkora, pontosan nem tudható, de a mérés szempontjából nincs jelentősége, hiszen azonos beállítások, eluens összetétel és peszticid koncentráció mellett az arány

mindig állandó. Természetesen mátrixhatás nem kizárólag peszticidek mérésekor tapasztalható, hanem minden olyan szerves vegyület mérésénél, ahol a célvegyületeket mátrix-szal terhelt környezetből kell meghatározni. Egy tanulmány, melyben gyógyszermaradékokat vizsgáltak szennyvizekből, kimutatták, hogy a mátrixhatás függetlenül attól, hogy pozitív vagy negatív, a kis tömegű molekulákat (<100 Da) érintette [KLOEPFER, 2005]. Továbbá a mátrixhatás az LC-MS ionforrásának kialakításától is függ [MEI, 2003]. A mátrixhatás pusztán léte nem jó vagy rossz tulajdonsága a méréstechnikának, hanem egyszerű velejárója, akármennyi komponenst határozunk meg egyszerre, akármilyen biológiai mintából, akármilyen minta-előkészítéssel akár LC, akár GC alapú technikával. Minőségi azonosítás esetén ennek kis jelentősége van, mennyiségi mérésnél azonban annál nagyobb, melyet helyes kalibrációval figyelembe lehet venni.

2.3.6.3 Kalibráció

A mennyiségi meghatározás alapfeltétele a kalibrálás, mely ismert mennyiségű sztenderdre kapott jelintenzitás összevetését jelenti a mintával.

A legegyszerűbb megoldás a **külső kalibráció**, mely a minta és a mátrix-szal nem terhet sztenderd oldat összehasonítása. Mivel a mátrixhatással számolni kell és ez komponens és mátrixfüggő is [NIESSEN, 2005], ezért ennek a sokkomponenses peszticid analitikában nincs létjogosultsága. A mátrix várt vagy nem várt hatását mindenképp figyelembe kell venni.

Ennek legpontosabb módja az **izotóp-jelzett peszticidekkel való kalibrálás**. Az izotóp-jelzett sztenderdek tömegükben térnek el a célpeszticidektől, így tömegszelektív detektorokkal ezek elkülöníthetők a célvegyületektől. Az izotópjelzett peszticidek kémiai tulajdonságai kromatográfiás szempontból ugyanolyanok, ezért ugyanolyan retenciónál eluálódnak és ugyanolyan mátrixhatást mutatnak, mint a célpeszticidek. Az izotóp-jelzett sztenderdek használatát azonban néhány dolog limitálja. MS/MS detektálás esetén ugyanúgy két átmenetet kell pásztázni, mint a célkomponens esetében, ami

így duplájára növeli a komponensek és átmenetek számát, felére csökkentve ezzel az egyszerre meghatározható peszticidek számát. Ami ennél jelentősebb, hogy áruk igen magas és nem minden peszticidből kapható izotóp-jelzett sztenderd. Bár ez a technika segít legjobban figyelembe venni a mátrix miatt bekövetkező jelváltozást, sokkomponenses módszereknél ritkán alkalmazzák.

A mátrixhatás kiküszöbölésére egy egyedi megoldás az úgynevezett „**árnyék-csúcs**” („**ECHO-peak**”) **technika**. Az MS ionforrásához egy T-elágazással két HPLC pumpát kapcsolnak. Mindkettőn ugyanolyan oszlopot és gradiens (vagy izokratikus) programot alkalmaznak. Az egyik rendszerbe a mintát injektálják, a másikba a sztenderd keveréket, de a minta bejuttatásától számítva nagyjából fél perc késleltetéssel. Ez azt eredményezi, hogy a mintából és a sztenderdből származó ugyanazon komponens egymástól fél perc eltéréssel jut az ionforrásba és kerül detektálásra. A sztenderd csúcsa tehát árnyékként követi a mintában esetlegesen található komponenst a két csúcs teljes szeparációja mellett. A retenciós időbeni kis különbség miatt a mátrixhatás különbségét elhanyagolják. Újabb átmenetek pásztázása (mint az **izotóp-jelzett** peszticidek esetén) nem szükséges. Bár hatékony technika, használata nem jelentős a sokkomponenses peszticid módszereknél [ZROSTLÍKOVÁ, 2002].

A leggyakrabban alkalmazott technika az úgynevezett **mátrix-illesztett kalibráció**. A meghatározni kívánt minta mátrixából kell extrakciót végezni, ami a célpeszticidek szempontjából vak, majd az extraktumhoz sztenderd keverék oldatot kell adagolni olyan koncentrációkban, mely reprezentálja a kalibrációs sort. Ez az úgynevezett „**poszt-extrakciós**” vagy „**extrakció utáni**” dúsítás. Az így felvett kalibrációs egyenes és a minta összemérésekor a mátrixhatás már teljesen ki van küszöbölve. Mivel a mátrixhatás mátrix és komponensfüggő, ezért minden mátrixra (amilyen mintákat meg akarunk határozni) külön kalibrációs sort kell felvenni. Ez azonban jelentősen megnöveli a mérések számát és nem költséghatékony, ezért az EU erre vonatkozó rendelete 2009-től engedélyezte a reprezentatív mátrixok használatát egyes zöldség- és gyümölcs csoportokra nem csak a kinyerési határfok tesztelésére, hanem kalibrációhoz is [internet 6]. Nehézség továbbá,

hogy vak mátrixot nehéz találni, főleg ha sok peszticidet akarunk egyszerre meghatározni.

A *mátrix-illesztett kalibráció* másik fajtája az úgynevezett **„sztenderd addíciós technika”**. Lényege, hogy a mintaextraktumra különböző koncentrációjú sztenderd keverékeket adagolnak, kialakítva ezzel a kalibrációs pontokat. Az adagolást különböző mátrixokon külön-külön el kell végezni, azonban egy sztenderd addíciós kalibrációs sor összevethető ugyanolyan mintamátrix-szal. Hátrány, hogy ha a minta nagy koncentrációban tartalmaz peszticid(ek)et, akkor az addíciónálás miatti többletkoncentrációra kapott jel esetlegesen már nem lesz benne a lineáris kalibrációs tartományban. Ennek megoldása lehet a minta olyan mértékben való hígítása, hogy az addíciónálás után is lefedje a lineáris tartományt. Az eredményeket ilyen esetben a hígítási faktorral extrapolálni kell.

A sokkomponenses peszticid analitikában a leggyakrabban **„poszt-extrakciós mátrix-illesztett kalibrációt”** vagy **„sztenderd addíciót”** alkalmaznak.

2.3.6.4 Kísérő sztenderd használata

Az, hogy egy bizonyos belső sztenderd használata a mátrixhatás variabilitása miatt nem lehetséges, egyértelmű. Helyette azonban kísérő, úgynevezett *„surrogate”* sztenderdet alkalmaznak, melynek nem a mátrixhatás kiküszöbölése a feladata, hanem az extrakció és mérés technika kontrollálása. A *„surrogate”* sztenderd felé támasztott követelmény, hogy peszticidekhez hasonló szerkezetű és molekulatömegű stabil komponens, valamint hogy az adott technikával jól mérhető legyen. A mintához adagolják extrakció előtt (pre-extrakciós adagolás), ezáltal jelezni tudja, ha az extrakció során jelentős hibát vétett az analitikus, ha nem megfelelő mintamennyiség került injektálásra, vagy ha a műszer érzékenysége valami hiba folytán váratlanul drasztikusan lecsökken. A *„surrogate”* sztenderd alkalmazása nem feltétlen szükséges, de ajánlott a kontrollálhatóság érdekében. GC és LC alapú

technikákhoz nem kizárólagosan, de a triphenyl phosphate (TPP) használata a legelterjedtebb.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Ahogy azt az irodalmi áttekintésben bemutattam, a sokkomponenses peszticid meghatározási módszerek az egy módszerben mérhető komponensek számában egyértelmű növekvő tendenciát mutattak/mutatnak. Ennek határt szabnak a módszerek kapacitásai, a minta-előkészítési technika – mátrix – peszticid háromszög kölcsönhatásai, a koeluálódó mátrixkomponensek és a detektálási technika kapcsolata, valamint maguk a peszticidek - azok kémiai tulajdonságai -, jelezve azt, hogy a módszerek rendkívül nagy összhangot igényelnek.

Doktori munkámban az alábbi, részben összefüggő, részben különálló témákat és célokat tűztem ki:

1. Multikomponenses módszer fejlesztése és alkalmazása nagyszámú (>150) peszticidre LC-MS/MS technikával. Céljaim ebben a témában az alábbiak:

- az „acetát-pufferelt QuEChERS” tesztelése a kiválasztott 160 peszticidre és három reprezentatív mintamátrixra; a mátrixok közti különbségek kutatása
- a fejlesztett módszer validálása
- a kromatográfiás és tömegspektrometriás interferenciák feltérképezése

2. Ezt a munkát folytatva a mérési paraméterek hatásainak vizsgálatára fektettem a hangsúlyt, melyeket 150 peszticiden teszteltem. A következő célokat fogalmaztam meg:

- ionizációs, kromatográfiás és tömegspektrometriás paraméterek hatásainak vizsgálata a peszticidek meghatározásának szempontjából
- UHPLC és HPLC elválasztás hatékonyságának és alkalmazhatóságának összehasonlítása

3. A 150-nél jóval nagyobb számú peszticid egy mennyiségi módszerbe való foglalása bár indokolt lenne, hogy több peszticidet monitorozzunk egyszerre,

ez detektálási határokba ütközik és több labormunkát is igényel. Egyes LC-MS/MS készülékek azonban olyan funkcióval is rendelkeznek, amely spektrumkönyvtárból való azonosításra is lehetőséget ad. Véleményem szerint hatékony lenne a két módszert kombinálni oly módon - ahogy erre már volt példa GC technika esetén [MEZCUA, 2009] -, hogy az egyik alkalmas 300 peszticid minőségi meghatározására (ezzel csupán pásztázzuk a mintát), és pozitív találat esetén a második módszerrel (kevesebb peszticid mennyiségi mérésére alkalmas) meghatározzuk az előzetesen azonosított peszticidek koncentrációját. Célkitűzéseim az alábbiak:

- kvalitatív (minőségi) és kvantitatív (mennyiségi) módszerek kidolgozása
- a két módszer kombinálási elvének kidolgozása
- az „acetát-pufferelt QuEChERS” és a módszer-kombináció alkalmazása nagyszámú kereskedelemből származó mintán
- módszerek előnyeinek és hátrányainak kutatása és kritikus tárgyalása

4. A módszerek több mint 90 %-a zöldség, gyümölcs, gabonafélék, és olaj minták mérésére összpontosul. Ezzel szemben a kis víztartalmú szárított élelmiszerek vizsgálata a perifériára került, ráadásul - részben ezért -, még gyerekcipőben jár. A kis víztartalmú élelmiszerek közül a fűszerek és a tea prognosztizálhatóan nagy hététeret produkál, akármilyen minta-előkészítést is használunk. Ebben az egységben ezért nem a nagyszámú peszticid együttes mérésére, hanem a mátrixhatás kiküszöbölésére törekedtem, ezért a következő célokat fogalmaztam meg:

- minta-előkészítési módszer kidolgozása néhány kiválasztott klórtartalmú peszticid meghatározására fűszerekből és teából
- detektálási módszer kidolgozása GC-MS/MS és GC×GC TOFMS kapcsolattal
- a módszerek validálása
- a meghatározáshoz alkalmazott fenti két technika kritikus összehasonlító elemzése a mátrixhatás tekintetében

Reményeim szerint, a céljaim megvalósításával rá tudok világítani a mai multikomponenses peszticidanalitika korlátaira és megoldásukra, mely a költséghatékonyságot igénylő rutin peszticidanalitika javára válhat.

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Vegyszerek és műanyag eszközök

Analitikai tisztaságú (nagyreszt kristályosított) peszticid sztenderdek a Riedel de Haën (Selze, Németország), Dr.Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Németország) és a Fluka - Sigma Aldrich (Steinheim, Németország) cégektől származtak. Az oldatkészítés után a maradék sztenderdeket fagyasztóban tároltam (-18 °C) az esetleges következő oldatkészítésig. Az 1000-4000 µg/ml koncentrációjú tömény sztenderd oldatokat az analitikai tisztaságú sztenderdekből készítettem egyenként oldva őket szerves oldószerben. Ehhez acetonitrilt (J.T. Baker; Deventer, Hollandia és Fischer Scientific; Loughborough, Egyesült Királyság), metanolt (Merck; Darmstadt, Németország) vagy dimetil-formamidot (Reanal; Budapest, Magyarország) használtam. Ezekből 10 µg/ml koncentrációban sztenderd keverék oldatokat készítettem, majd ebből hígítottam a kalibrációs pontokat. A tömény oldatokat évente, a keverék oldatokat háromhavonta készítettem, melyeket felhasználásig a fagyasztóban (-18 °C) tároltam. Hígabb oldatokat (kalibrációs sor) készítés után maximum két hétig használtam és a mérésig hűtve (+4 °C) tároltam őket. Minden hígításhoz (ahol szükséges) és folyadékkromatográfiás oldószerként is a Milli-Q SP rendszer (Millipore; Bedford, MA, USA) által előállított ioncserélt vizet alkalmaztam. A QuEChERS minta-előkészítéshez vízmentes MgSO₄-ot (Fluka – Sigma Aldrich és Scharlau Chemie S.A.; Sentmenat, Spanyolország), Na-acetátot (Merck), PSA-t (Supelco; Bellefonte, PA, USA), 15 és 50 ml-es PTFE anyagú mintatartó edényeket (TPP; Trasadingen, Svájc) használtam. A minták elpárologtatását nitrogénáram alatt végeztem. Minden mintát injektálás előtt 0,45 µm (HPLC esetén), vagy 0,22 µm (UHPLC esetén) porozitású PVDF (polyvinylidene difluoride) teflon szűrőn (Roth; Karlsruhe, Németország) tisztítottam. A HPLC elválasztáshoz eluensként acetonitrilt és ioncserélt vizet alkalmaztam. Az ionizáció elősegítésére módosítószerként kis mennyiségben hangyasavat, ammónium-acetátot és ammónium-formiátot (Fluka – Sigma Aldrich), használtam. Gázkromatográfiás mérésekhez hélium gáz szolgált vivőgázként, az injektált mintákat etil-acetátban (J.T. Baker) oldottam.

Sztenderdek oldására és hígítására 7 ml-es PTFE anyagú csavaros tetővel ellátott üvegedényeket (Supelco) alkalmaztam. A minták injektálásához 2 ml-es mintatartó üvegedényeket (Supelco és Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) használtam.

4.2 Műszerek

Az alkalmazott műszerek beállítási paramétereit - mivel azokat optimálás után véglegesítettem és ez szerves része volt a kutatómunkámnak -, az eredmények egyes fejezeteiben részletesen taglalom.

4.2.1 HPLC-MS/MS

Agilent 1100 típusú HPLC rendszert alkalmaztam a folyadékkromatográfiás elválasztáshoz, mely gáztalanító, pumpa és oszloptermosztát egységekből épült fel. A mintaadagoló egység Agilent 1200 volt. Kísérleteim során 2 típusú fordított fázisú oszlopot alkalmaztam:

- Agilent Zorbax XDB C8 150 mm × 4,6 mm; 5 µm szemcseméret
- Agilent Zorbax XDB C8 100 mm × 2,1 mm; 1,8 µm szemcseméret

A HPLC-MS/MS kísérleteimet Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Little Falls, DE; USA) és Applied Biosystems 3200 QTRAP LC/MS/MS (Applied Biosystems/MSD Sciex, Foster City, CA; USA) műszeren végeztem.

A műszereket az alábbi módokban használtam:

Full Scan mód

A gyártók saját szoftverükben ezt Q1 MS (Agilent) illetve Q1 és Q3 (Applied Biosystems) módnak nevezik. Lényege, hogy a három kvadrupol közül csak egy üzemel teljes pásztázási módban, a másik kettő tömegszűrés nélkül

funkcionál. Módszerfejlesztéshez, a peszticidek kvázi-molekulaionjainak azonosításához használtam ezt a módot.

SRM (Selected Reaction Monitoring=Kiválasztott Átmenet Monitorozás) mód

Bár mindkét műszergyártó ezt a módot MRM (Multiple Reaction Monitoring=Többszörös Átmenet Pásztázás) módnak nevezi, a peszticid analitikai szakirodalomban mégis az SRM megnevezés a hivatalos. Ennek oka, hogy az MRM a Multi Residue Method, azaz a multikomponenses módszer rövidítése is, ami ez által összetéveszthetőségre ad lehetőséget. A mód lényege, hogy az első kvadrupolban (Q1) kiválasztott kvázi-molekulaionból - mely pozitív módban leggyakrabban $[M+H]^+$, negatív módban pedig $[M-H]^-$, a második kvadrupolban (q2) megfelelő feszültség és nitrogéngázzal való ütköztetés után fragmens ionok keletkeznek, melyekből a harmadik kvadrupol (Q3) tömegszűrője az analitikus által kiválasztott iont engedi a detektorba. SRM módban tehát a komponensek kvázi-molekulaion – fragmens ion átmeneteit pásztázzuk.

EPI (Enhance Product Ion=Termékion Monitorozás) mód

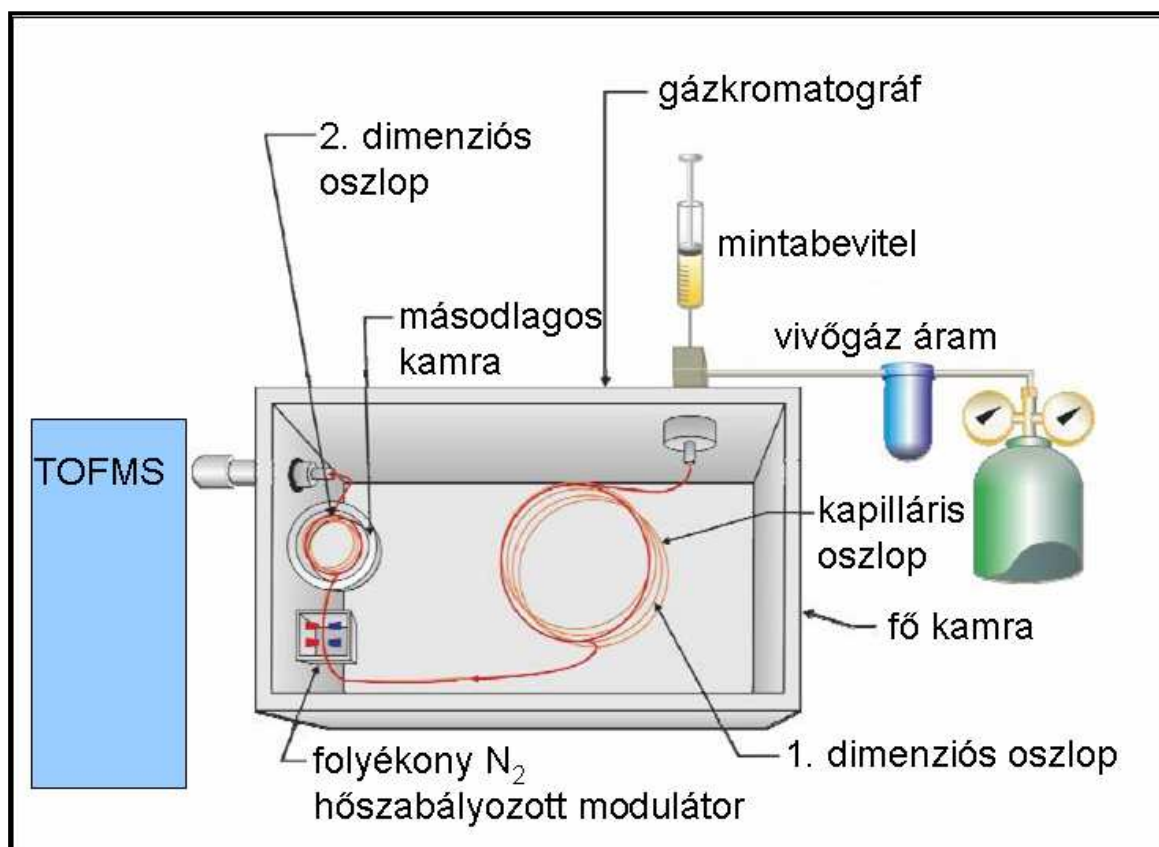
EPI módot az Applied Biosystems készüléken alkalmaztam. Lényege, hogy egy komponensről egy átmenetet pásztáz a fent leírt SRM (MRM) módban. Ha az átmenet intenzitása átlép egy, az analitikus által beállított alapértéket (IDA=Information Dependent Analysis=Információfüggő Analízis), akkor az átmenetet okozó kvázi-molekulaiont a q2-ben egy előre beállított ütközési energia segítségével fragmentálja. A keletkező fragmens ionokat a Q3 előre meghatározott időtartamig csapdázza, majd a detektorba engedi. Ezzel érzékenység-javulás érhető el. A keletkező fragmensek, mint egy ujjlenyomat jellemzőek a cél molekulára, mely a meghatározás alapja.

4.2.2 GC-MS/MS

Kísérleteimhez Varian 4000 GC/MS/MS ioncspdás készüléket használtam. Az elválasztáshoz Agilent HP-5MSI 30 m × 0,25 mm, belső felületén 0,25 µm 5 % fenil / 95 % metil-polisziloxán filmréteggel ellátott kapilláris oszlopot alkalmaztam. A nagy térfogatú injektálásra alkalmas PTV injektor liner egysége SiltekTM (Restek GmbH, Hamburg, Németország) bevonatú volt.

4.2.3 GC×GC TOFMS

A kétdimenziós elválasztáshoz Leco Pegasus4D típusú GC×GC TOFMS berendezést alkalmaztam (Leco St. Joseph, Michigan, USA), melynek vázlati képe az **5. ábrán** látható.



5. ábra GC×GC TOFMS műszer felépítése

A műszer nagy előnye az egydimenziós elválasztáshoz képest, hogy az első oszlopról eluálódó egydimenziós kromatogramot a folyékony nitrogén által

szabályozott modulátorral vékony „szeletekre” vágjuk, majd ezeket, mint individuális mintákat a második oszlopra „injektálja” a rendszer. Természetesen ez kvázi-injektálás, a második oszlop rövid, és csak pár másodperces elválasztást tesz lehetővé. Erről eluálódva EI ionizáció után a TOFMS-be jut a minta, majd a műszer szoftveresen kétdimenziós kromatogramot készít. A műszer kapacitásával és beállításaival az eredmények megfelelő fejezetében bővebben foglalkozok. Az elválasztáshoz az alábbi kapilláris oszlopokat használtam:

- Agilent HP-5MS UI (5 % difenil, 95 % dimetil-sziloxán) 30 m × 0,25 mm; 0,25 µm filmréteg (apoláros primer oszlop)
- Restek Rxi-17 (kereszt-kötésű 50 % difenil, 50 % dimetil-polisziloxán) 1 m × 0,10 mm; 0,10 µm filmréteg (közepesen poláros szekunder oszlop)
- Restek Rt-LC50 (szabadalmazott folyadékkristályos fázis) 1 m × 0,1 mm; 0,1 µm filmréteg (erősen poláros szekunder oszlop).

5 EREDMÉNYEK

5.1 Multikomponenses módszer (>150 peszticid) fejlesztése és alkalmazása LC-MS/MS technikával

5.1.1 A célkomponensek kiválasztása

A módszerfejlesztés első lépése a peszticidek kiválasztása, hiszen olyan módszert akartam fejleszteni, melynek gyakorlati haszna van. Ezért céлом 150-nél több LC-vel mérhető növényvédőszer hatóanyag kiválasztása volt szakirodalomból és az internetes forrásokból, melyek mindegyikére jellemző, hogy az alábbi csoportok közül legalább az egyikbe beletartozik.

1. csoport: Az Európai Irányelv első listájából (EU Directive 91/414/EEC; Annex I.) 40 LC-vel mérhető peszticidet választottam, amely a lista 23 %-át jelenti.

2. csoport: 21 olyan peszticid, melyeknek jelentős egészségügyi vonatkozásai vannak. Ezek használatát az EU-ban nem, de más országokban engedélyezik.

3. csoport: A zöldségekre és gyümölcsökre vonatkozó európai körmérési (EUPT) listából az összes LC-vel mérhető peszticid [**internet 7**].

4. csoport: 56 olyan LC-vel mérhető peszticid, melyet az EU-ban kereskedelemről származó mintában detektáltak a 2000-2007-ig terjedő időszakban. Az adatokat a *pesticides-online* weboldaltól gyűjtöttem [**internet 2**].

A csoportok között átfedések miatt a végső lista 160 peszticidet tartalmaz. A csoportos besorolást a detektálási paraméterek táblázatába foglaltam (lásd a **mellékletek / 1. táblázatában**).

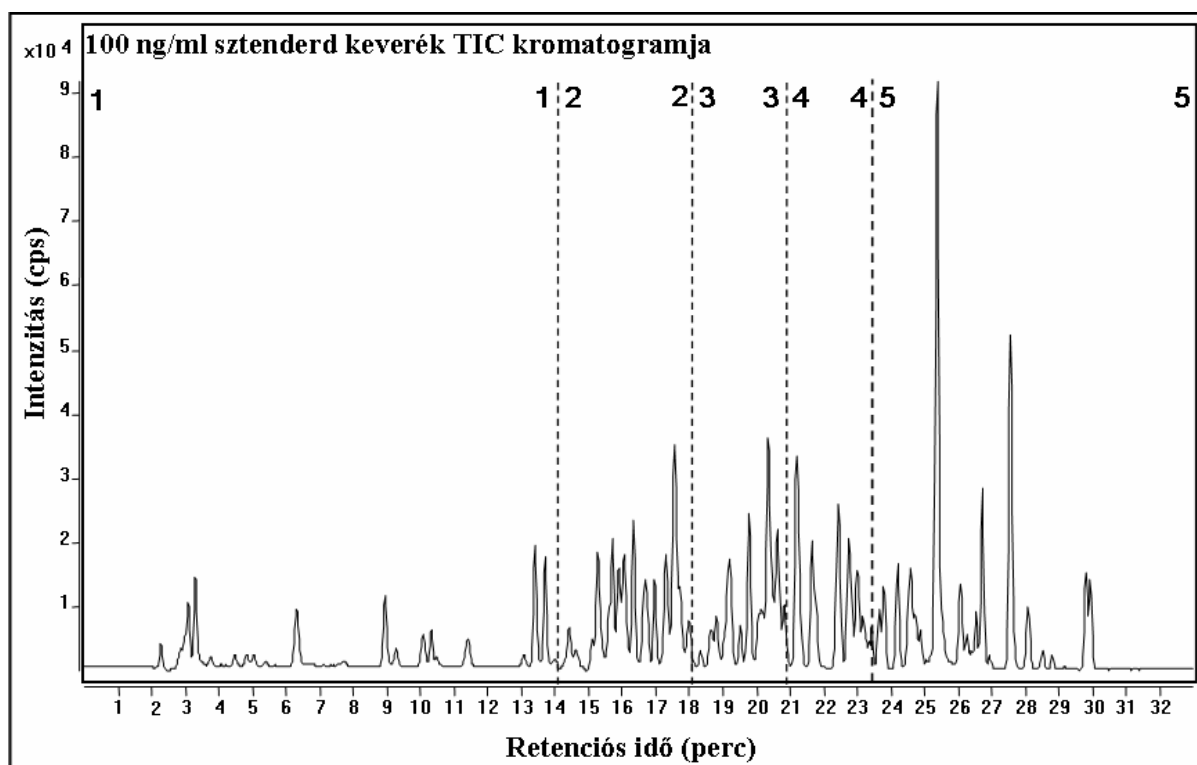
5.1.2 Mérési paraméterek optimalítása

Ahhoz, hogy a kiválasztott peszticideket tömegspektrometriásan detektálni lehessen, az első lépés a detektálási paraméterek optimalítása volt. Ezért minden tömény (általában kristályos) peszticid sztenderdből különálló, 1-3 µg/ml koncentrációjú sztenderd oldatot készítettem acetonitrilben oldva. Az Agilent 6410 Triple Quad LC/MS/MS műszeren nincs lehetőség a sztenderd oldat folyamatos ionforrásba juttatására, ezért az optimalást kis mennyiségű sztenderd többszöri injektálásával oldottam meg. Ennek során nincs szükség kromatográfiás oszlop használatára, az 1 µl mennyiségű sztenderd oldatot 0,2 ml/perc-es áramlási sebességű acetonitril:víz (+0,1 % hangyasav) 50:50 keverékébe injektáltam. A 0,1 % hangyasav (HCOOH) az ionizáció elősegítésére proton donorként funkcionál. Az optimalás első lépése a kvázi-molekulaionok megkeresése és azok intenzitásának maximalizálása volt. Az ionforrásban a fragmentor feszültség arra szolgál, hogy a folyadékáramból keletkező gázfelhőben a kialakult klasztereket darabjaira szedje, amivel a bejuttatott peszticid kvázi-molekulaionok mennyisége növelhető. Erre 60, 90, 120 és 150 V beállítást teszteltem úgy, hogy különálló egyperces gyorsmódszereket hoztam létre eltérő fragmentor feszültséggel, és minden peszticid esetén az optimális beállítást választottam. Ekkor Q1 MS módban használtam a készüléket a kvázi-molekulaionok nyomon követésére. Várakozásaimnak megfelelően általában hidrogén-adduktok ($[M+H]^+$) megjelenését tapasztaltam, ami a molekula tömegénél 1-gyel nagyobb tömegben jelentkezik ($[M+1]$). Ritkábban nátrium-addukt ($[M+Na]^+=[M+23]$) megjelenését is tapasztaltam, mely általában intenzívebb jelet adott, mint a hidrogén addukt. Ennek ellenére mindig a hidrogén addukt optimalását folytattam két okból is: (i) a nátrium-addukt pozitív töltése a nátriumhoz tartozik és a molekulán belüli átcsoportosulása nehézkes, ezért fragmentálásakor nagyrészt nátrium-vesztés (a töltéssel együtt) következik be lehetetlenné téve ezzel a molekula további fragmentálását, és (ii) a nátrium a rendszerbe a kristályos sztenderd szennyezőanyagaként kerülhet, és elválasztás nélkül okozhat Na-adduktot. Elválasztással azonban a rendszerbe injektált minta vagy sztenderd nátriumtartalma a fronttal együtt eluálódik, ezért nem okoz Na-adduktot. A következő lépés a kiválasztott anyaiion

fragmentálása. Ez a középső quadrupolban történik, mely ütközési cellaként funkcionál, a belevezetett ütközési gáz (nitrogén gáz) és a bejutott kvázi-molekulaionokkal közölt ütközési feszültség (CE=collision energy) miatt azok fragmensekre szakadnak. Ennek optimalizálását is egyenkénti injektálással végeztem 5, 10 15 és 20 V ütközési energia mellett (szintén egyperces egyedi módszereket hoztam létre). A két legintenzívebb fragmenst választottam, az optimum feszültség értékeket pedig úgy állapítottam meg, hogy a keletkező fragmens-sel együtt a kvázi-molekulaion még látszik az eredeti intenzitásának körülbelül 10-30 %-ával. Egyes komponensek (cyprodinil, propargite, quinoxifen és TPP) fragmentálásához a 20 V kevésnek bizonyult, ezért ezeket 25, 30, 35 és 40 V ütközési energiával próbáltam fragmensekre bontani (lásd a **mellékletek / 1. táblázat**). Két átmenet detektálását csak a spinosyn D nem tette lehetővé. A phosmet esetében is csak egy fragmenst észleltem a hidrogén addukt esetén, ezért a phosmet-re nagy intenzitással jellemző Na-adduktból keletkezős átmenetet választottam. A komponensekhez tartozó átmeneteket és az optimum paramétereket a **mellékletek / 1. táblázat** tartalmazza. A kromatográfia fejlesztésére nem fektettem nagy hangsúlyt, peszticidek méréséhez egy jól bevált HPLC oszlopot választottam (lásd 4.2.1), szerves oldószer gradienst (**mellékletek / 1. ábra**) alkalmaztam és minden esetben 10 µl mintamennyiséget (acetonitril:víz 20:80) injektáltam.

A detektálást 15 msec/átmenet pásztázási sebességben határoztam meg (5-100 msec/átmenet sebesség lehetséges), mely elegendő érzékenységet biztosított részben azért is, mert az Agilent 6410 Triple Quad LC/MS/MS műszeren egy időablakba maximálisan 100 átmenet pásztázására van lehetőség. Ez azt jelenti, hogy ezzel a pásztázási sebességgel egy ciklus 1500 msec-ig, azaz másfél másodpercig tart. A csúcsok szélessége 0,3 - 0,8 perc, ami 12-32 ciklust jelent, azaz ennyi pont lesz adott egy csúcs meghatározásához, amely tapasztalataim alapján elegendőnek bizonyult. 160 peszticid együttes mérése tehát 320 átmenetet jelent (a spinosyn D egyetlen átmenete miatt ez pontosan 319), következésképp több időablakra van szükség. Hogy egyáltalán hány időablak kell, és hogy egy peszticid melyik időablakba kerüljön, közbülső módszerek létrehozásával oldottam meg. Több egymástól független módszert alakítottam ki a rendelkezésre álló optimális paraméterekkel úgy, hogy egy

módszer csak egy időablakot (100 átmenetet) tartalmazzon, majd a 160 peszticidet tartalmazó sztenderd keveréket (acetonitril:víz 20:80) ezekkel a módszerekkel a fenti elválasztás-technikát alkalmazva mértem. A mérésekből csak a peszticidek retenciójára voltam kíváncsi, melyeket összegyűjtöttem, majd elúció szerint sorba rendeztem. Mivel a sokkomponenses módszereknel a koelúció jelensége gyakori, ezért nem lehet egy konkrét határt húzni két időablak között. Továbbá retenciobeli kisebb csúszások esetén (oszlopöregedés, minta befolyása, nem szabályozott oszlophőmérséklet) a határhoz közel eluálódó komponensek csúcsainak egésze vagy része átkerülhet a másik ablakba. Az ablakok határainak pontos definiálását pedig a módszer megköveteli. Ennek megoldására két időablak határán (± 1 perc) eluálódó komponenseket mindkét időablakban detektáltam. Ezért az elméletileg szükséges 3 helyett 5 időablak létrehozását követelte meg, melyek kezdő pontjai: 0; 14,1; 18,1; 20,9 és 23,4 perc. A 160 peszticid elválasztásának teljes ionkromatogramját a **6. ábrán** szemléltetem.



6. ábra 160 peszticidből álló 100 ng/ml koncentrációjú sztenderd mix TIC kromatogramja, valamint az öt időablak

Látható, hogy a peszticidek eloszlása nem egyenletes, a kromatogram középső részében a legsűrűbb a komponensek elúciója, következésképpen az időablakok itt keskenyebbek.

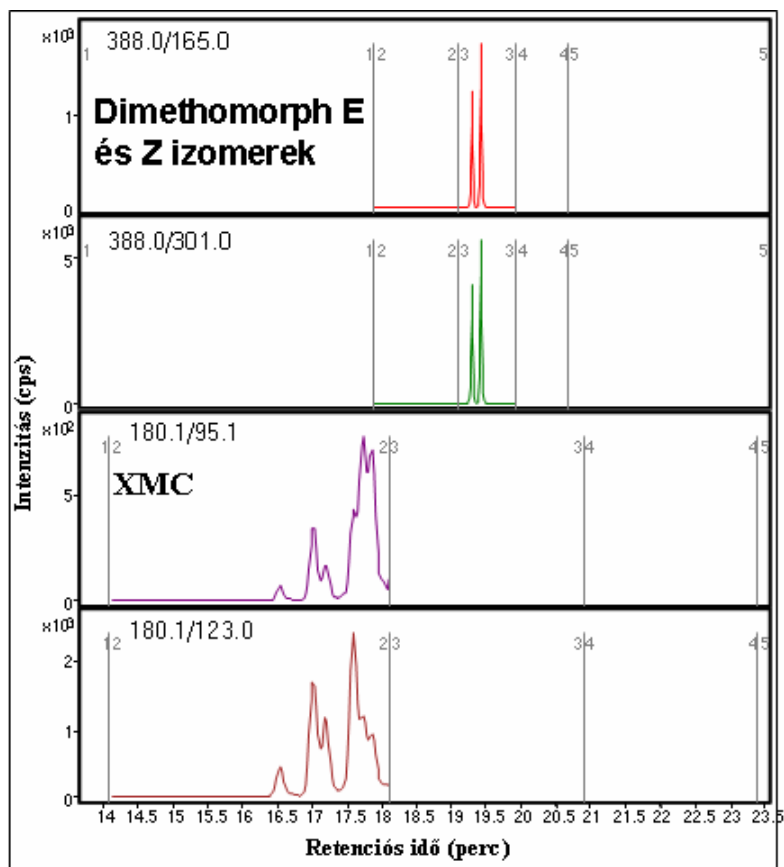
A detektálás további általános paramétereit: porlasztógáz nyomása 50 psi, hőmérséklete 325 °C, áramlási sebessége 12 l/perc; a kapilláris feszültség pedig 5000 V volt.

5.1.3 Peszticidek azonosítása

A mintában a komponensek azonosításához MS/MS detektálással az alábbi feltételeknek kell együttesen teljesülniük:

- (i) a retenciós idő megegyezik a sztenderd retenciós idejével
- (ii) mindkét átmenet ugyanennél a retenciónál jelentkezik
- (iii) a két átmenet által rajzolt csúcs területének aránya (SRM arány) a mintában és a sztenderd esetében is kisebb eltéréssel (lásd **1. táblázat** a 2.3.6.1 fejezetben) azonos.

A csúcsalak és csúcsszélesség néhány kivételt leszámítva megfelelő volt. A kivételes esetekben túlzott csúcsszélesedés vagy izomerek miatti dupla csúcsok jelentkeztek. A **mellékletek / 1. táblázat** retenciós idő oszlopában ezeket jelöltem. A jelenség tipikus példái a **7. ábrán** látható dimethomorph E és Z izomereinek dupla csúcsa, valamint az XMC csúcsszélesedése.



7. ábra Átlagostól eltérő csúcsalakot produkáló komponensek, példa

Az MS/MS detektálás nem teljesen szelektív, sokkomponenses módszereknél jelentkezhetnek izomerek; azonos tömegű kvázi-molekulaiont adó, de eltérő komponensek; és közös átmenetek, de ez a legtöbb esetben nem jelent problémát. Az emamectin benzoate sztenderd a két izomerének (emamectin benzoate B1A és B1B) 80/20 arányú keveréke. A két izomer optimálását technikailag nem lehet külön végezni. A két izomer csúcsainak aránya eltért a mixben levő mennyiségi arányuktól és nem is lehet kategorikusan kijelenteni, hogy a különbség az a mennyiségi különbségükből fakad. Izomerek mennyiségi meghatározásánál ezért az analitikusnak minden kromatogramon egyenként ellenőriznie kell, hogy a szoftver automatikus integrálási funkciója az izomereket egyben integrálja-e és ha szükséges, manuális integrálást kell alkalmazni.

Néhány esetben a dupla csúcs nem izomerek miatt, hanem két komponens közös átmenete miatt jelentkezik. A 160 peszticid együttes meghatározásakor három peszticid-pár: terbuthylazine-propazine, prometryn-terbutryn, és

diuron-fluometuron produkált közös átmenetet. Az első két párnak 1-1 közös átmenete van és retenció alapján a propazine és terbuthylazine elkülönülnek **(mellékletek / 2. ábra)**, így a meghatározás egyértelmű. Ezzel szemben a prometryn és terbutryn együtt eluálódnak, ezért meghatározásukkor a két átmenet arányát figyelmen kívül kell hagyni, mert a koelúció miatt torzul. A diuron-fluometuron párnak mindkét mért átmenete közös, de retenció alapján az elkülönítésük megoldott.

Az SRM arány értéke tipikusan 100 % alatti, mert a kevésbé érzékeny átmenet intenzitását viszonyítja az érzékenyebbéhez. Azt tapasztaltam, hogy a vizsgált komponensek SRM aránya 5 és 100 % között (főként 7-50 %) alakult és csak 5 %-uk mutatott 5-7 %-os SRM arányt, de még a jóval érzéketlenebb második átmenet sem akadályozta a komponensek kis koncentrációban való meghatározását. A komponensek több mint 90 %-a esetén tapasztaltam, hogy az SRM arány komponensenkénti szórása <25 %, ami összhangban van a SANCO rendelet erre vonatkozó részével. A vizsgált peszticidek közel 10 %-a mutatott 25-80 % szórást, ami a kevésbé érzékeny komponensekre (bendiocarb, carbofuran, ethion) volt jellemző, vagy a második (mennyiségi) átmenet alacsony intenzitásából fakadt (metobromuron). Egyes peszticidek SRM arányának szórását maga a mátrix is befolyásolhatja. Ezt tapasztaltam butocarboxin (paradicsomban) és difenoconazole (körtében) esetében. Az SRM arány 50 %-os értékét csak három peszticid lépte túl: fipronil paradicsomban, valamint triadimenol és alachlor körte mátrixban.

A phosmet és a methomyl SRM arányt nem lehetett kalkulálni, mert a minőségi átmenet intenzitása túl alacsony volt, a spinosyn D pedig alapvetően egy átmenetet adott.

5.1.4 Minta-előkészítés

A tanulmány célja az volt, hogy egy már kifejlesztett minta-előkészítési módszert teszteljek sok peszticiden és reprezentatív mátrixokon. Ezért az „acetát-pufferelt QuEChERS” minta-előkészítést választottam (részletekért

lásd a 2.3.2.3 fejezetet) és ennek hatékonyságát akartam tesztelni paradicsom, körte és narancs mintákon, melyek a nagy víztartalmú, nagy cukortartalmú és nagy savtartalmú mintákat reprezentálják. A minta-előkészítés eredményeként kapott acetonitriles extraktum ebben a formában nem megfelelő injektálásra, mert a gradiens program 20 % acetonitril koncentrációval indul és tiszta acetonitriles extraktum injektálásakor ez széles csúcsokat eredményez. Ezért oldószert váltottam: 800 µl 100 % acetonitriles extraktum elpárologtatása után (nitrogén áram alatt) a mintát 20 % (160µl) acetonitril + 80 % (640 µl) vízbe oldottam. Fontos megjegyezni, hogy a jobb visszaoldás érdekében acetonitril és víz ilyen sorrendű elkülönített adagolása előnyösebb, mint 800 µl 20/80 arányú már eleve összekevert eleggyel oldani. A mátrix-illesztett kalibrációs pontokat olyan, úgynevezett vakminták extraktumainak felhasználásával alakítottam ki, melyeket bio-üzletben vásároltam és felhasználás előtt alaposan megmostam folyóvíz alatt, hogy minimálisra csökkentsem a lehetséges szennyeződést. Az így nyert acetonitriles vak extraktumok bepárlása után ugyanolyan mennyiségű, a kalibrációs pontoknak megfelelő koncentrációjú sztenderd oldatokkal (acetonitril/víz 20/80) oldottam vissza.

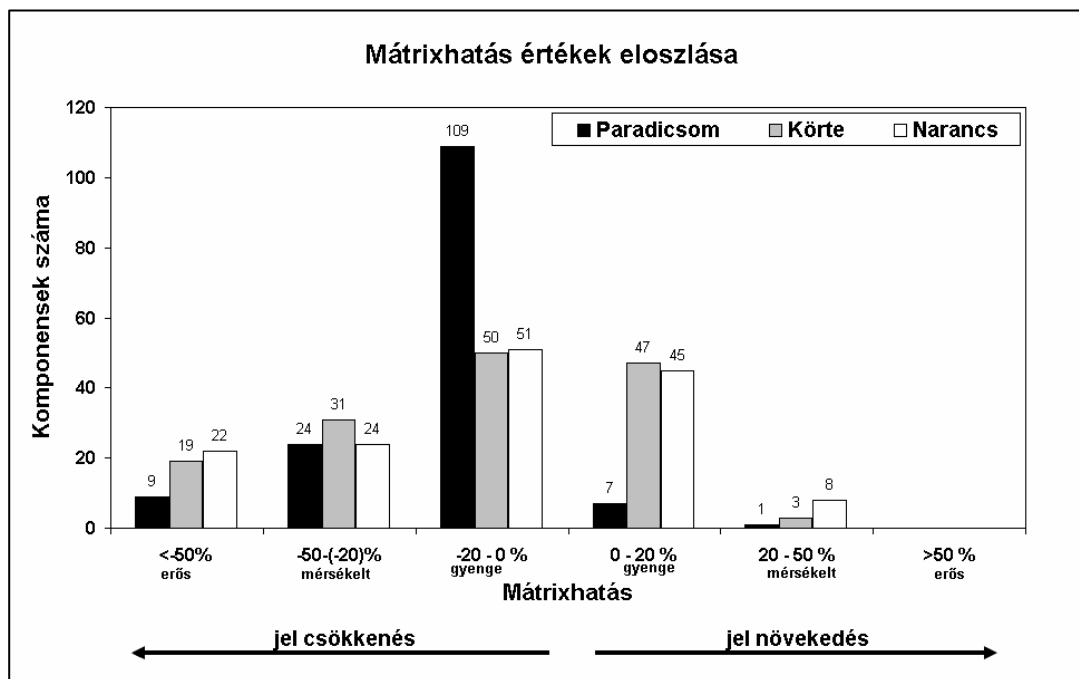
5.1.5 Validálás

5.1.5.1 Linearitás és mátrixhatás

A linearitás és mátrixhatás tanulmányozására 7 pontos kalibrációt terveztem oldószerben, valamint paradicsom, körte és narancs mátrixokra illesztve 5-10-25-50-100-250 és 500 ng/ml koncentráció szinteken. Ez összhangban van a műszer érzékenységevel és a zöldségekre és gyümölcsökre vonatkozó EU MRL értékekkel is. A kalibrációs egyenesek meredekség és korrelációs koeficiens értékeit, valamint a mátrixhatásra vonatkozó adatokat a **mellékletek / 2. táblázat** foglalja össze. A vizsgált peszticidek 82 %-ára $>0,99$, 96 %-ára pedig $>0,96$ korrelációs koeficiens értéket (R^2) tapasztaltam a vizsgált 5-500 ng/ml koncentráció tartományban. Rossz linearitást ($R^2 < 0,90$) csak néhány peszticid (acephate, isocarbofos, lufenuron, propargite

és pyridaben) mutatott főként paradicsom és körte mátrixban. Tíz peszticid (alanycarb, chlorpropham, cymoxanil, diafenthiuron, dichlofluanid, dinotefuran, phosmet, prophaphos, pyrimidifen és spiromesifen) eredményeit nem vettem figyelembe a validálás további részében, mert az alacsony érzékenységük miatt nem várhattam releváns információt. Ezért a **validálás** további részének **statisztikáját** a maradék **150 peszticidre alapoztam**.

Azt, hogy a mátrix befolyással van a peszticidek mérésére, már régóta ismeretes és sok szakirodalmi cikk publikálta már. Ez abban nyilvánul meg, hogy a mátrix hatására a kalibrációs egyenes meredeksége megváltozik, torzul a tiszta oldószerből való méréshez képest. Ha ez a meredekség emelkedését okozza, akkor jelerősödéstről, ha a meredekség csökkenését okozza, akkor jelgyengülésről beszélünk. Az értelmezhetőség érdekében a statisztikai értékeléshez kategóriákat hoztam létre. Ezek alapján gyenge (-20 % - +20 %), mérsékelt (-50 % - -20 % és +20 % - +50 %) és erős (<-50 % és >+50 %) mátrixhatásról beszélhetünk. A mátrixhatás e kategóriák alapján történő besorolása a **8. ábrán** szemléltetett eloszlást mutatta.



8. ábra Mátrixhatás értékek eloszlása (150 peszticid statisztikája; pontos értékeket lásd a **mellékletek / 2. táblázatában**)

Az ábrán jól látszik, hogy a paradicsom a másik két mátrixtól eltérően főleg gyenge hatást gyakorol a kalibrációs egyenesek meredekségére. Mindhárom mátrix nagy víztartalommal rendelkezik, de a paradicsom a másik kettőhöz képest egyszerűbb mátrixnak mondható, kevesebb a minta-előkészítés során az acetonnitriles fázisba oldódó mátrix-komponensek mennyisége, amelyek befolyásolhatják a meredekséget. Ezzel szemben az extraktum a körtéből származó cukrot és gyümölcsviaszt, a narancsból pedig cukrot és növényolajt (héj részből) tartalmaz elsősorban. Színanyagok beoldódását paradicsom és narancs esetén szabad szemmel is lehet látni. A körte színanyagai is valószínűleg beoldódtak, de vizuálisan ez nem észlelhető.

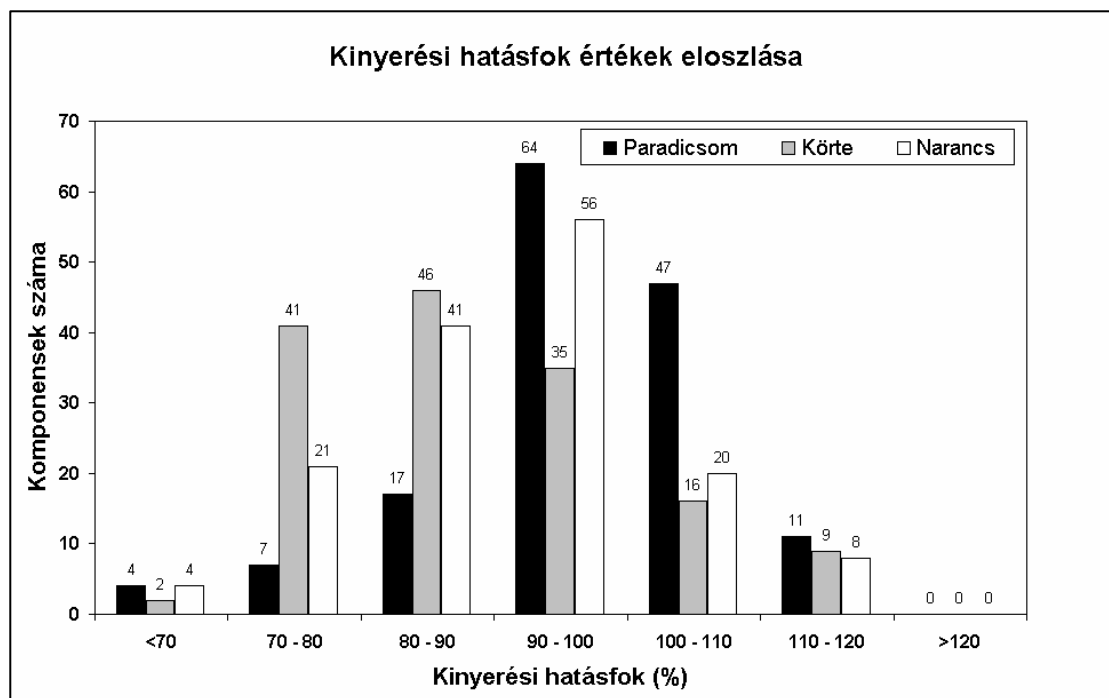
Ahogy azt a **mellékletek / 2. táblázatának** adatai mutatják, a mátrixhatás komponens és mátrixfüggő is. Érdekesség, hogy erős jelnövekedés egyetlen esetben sem volt tapasztalható, a hatás nagyrészt jelcsökkentő, ami azt feltételezi, hogy az együtt eluálódó mátrixkomponensek az ionforrásban versengenek a peszticidekkel a pozitív töltésekért, ezért a peszticidek abszolút mennyiségének kisebb hányada tud majd ionizálódni. Néhány peszticidet érdemes kiemelni, mert ezek erős jelcsökkenést mutattak mátrixban, függetlenül a mátrix fajtájától. Ezek a flufenoxuron, lufenuron, miconazole, propargite, pyridaben, triclocarban.

A mátrixhatás diverzitása azt vonja maga után, hogy mennyiségi mérésekhez alkalmazott kalibráció mindig mátrix-illesztett kell, hogy legyen, sőt az sem elég, ha egyetlen mátrixra illesztjük azt, amit jól mutat a paradicsom különbözősége a körtétől és a narancstól. A saját mátrixra illesztett kalibráció ajánlott, aminek tompítását a SANCO rendelet a költséghatékonyság érdekében oly módon engedélyezi, hogy szabályozott lehetőséget biztosít mátrix csoportok egy rájuk jellemző mátrixra illesztett kalibrálására [**internet 6**].

5.1.5.2 Minta-előkészítés hatékonysága: a kinyerési hatásfok vizsgálata

A minta-előkészítés hatékonyságát úgy tudjuk tesztelni, ha ismert mennyiségű célvegyületet próbálunk meghatározni egy célmátrixban. Ennek gyakori módja a CRM (Certified Reference Material), azaz a hitelesített anyagminta

használata. A sokkomponenses módszerek esetében azonban a célkomponensek számának változatossága miatt CRM nem áll rendelkezésre. Egy jól bevett szokás, hogy minden labor a saját peszticid-kutatásainak megfelelően maga készíti el a dúsított mintát, az LRM-et (Laboratory Reference Material), azaz a laboratóriumi referencia anyagmintát. A kinyerési határfok tesztelését ezért két dúsítási szinten: 10 és 100 µg/kg tűztem ki célul. Előzetesen jól megtisztított úgynevezett „vakminta” homogenizátumából két tiszta üvegedénybe egyenként 100 g mennyiséget mértem be, majd ehhez 1 ml 100 illetve 1000 ng/ml koncentrációjú sztenderd keverék oldatot adagoltam acetonitrilben oldva, hogy elérjem a 10 illetve 100 µg/kg dúsítási szintet. A mintákat ezután rozsdamentes acélkanállal 30 perc alatt alaposan elkevertem. A vizsgálathoz minden dúsítási szinten minden mintából 6 párhuzamos extrakciót végeztem, amely összesen 36 extrakciót jelent. Ezeket a fejlesztett módszerrel mértem, a mennyiségi meghatározáshoz pedig saját mátrix-illesztett kalibrációt használtam. A 100 µg/kg dúsítási szint mérési eredményeit a **mellékletek / 3. táblázat** tartalmazza, a kinyerési határfok értékek eloszlását pedig a **9. ábrán** szemléltetem.

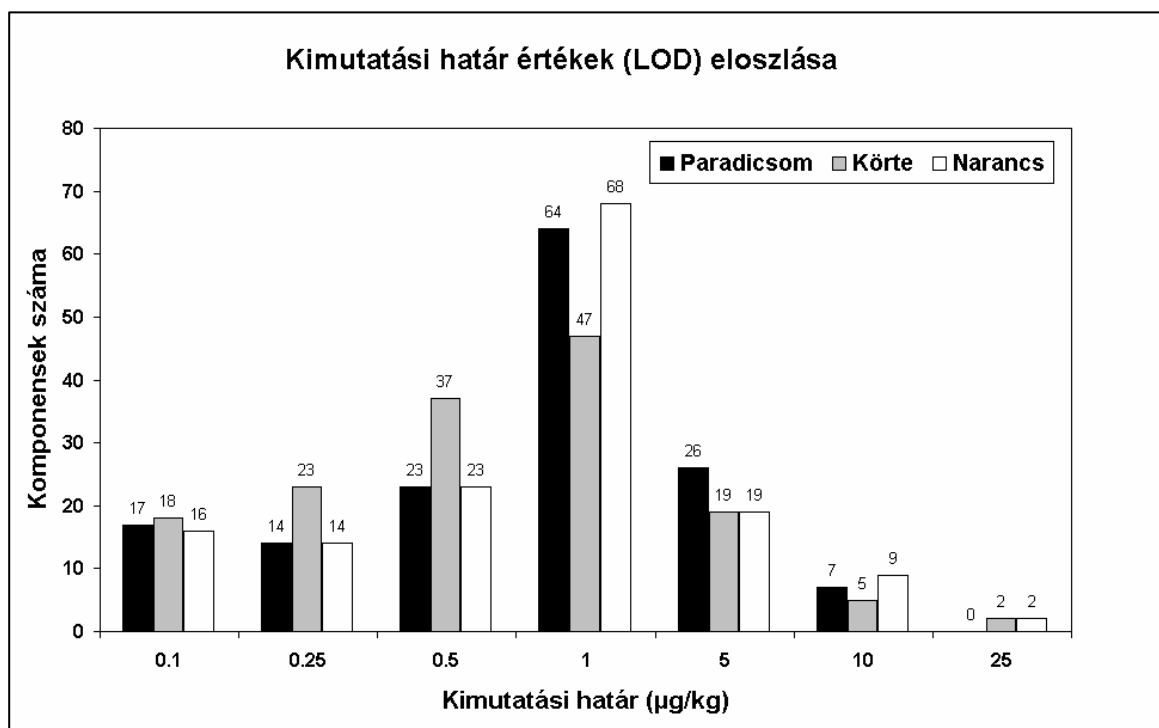


9. ábra Kinyerési hatások értékek eloszlása az alkalmazott „acetát pufferelt QuEChERS” előkészítéssel (150 peszticid statisztikája)

A kinyerési hatások értékek minden mátrix esetében Gauss-i eloszlást mutattak. A fenti ábra jól mutatja, hogy a statisztikai értékelés alapját képező peszticidek több mint 95 %-a a SANCO rendelet által előírt 70-120 %-os elfogadási intervallumba esik, ami az „acetát-pufferelt QuEChERS” hatékonyságát bizonyítja. A cyromazine és a fluazifop kinyerési hatásfoka szisztematikusan 70 % alatti volt mindhárom mátrixban. A fipronil kinyerése is 70 %-nál rosszabb paradicsom és narancs mátrixban, amihez nagy szórás értékek párosultak (lásd a **mellékletek / 3. táblázatában**). Ennek az oka valószínűleg az alacsony érzékenység. Néhány peszticid bár elfogadható, de szisztematikusan alacsony kinyerhetőséget mutatott: fluroxypyr (78 %, 76 %, 80 %), és thiophanate ethyl (84 %, 84 %, 78 %) a paradicsom, kőrté és narancs mátrixban. Továbbá alacsony kinyerési hatásfok értékeket tapasztaltam speciális mátrix-pesticid kombinációkon, mint a teflubenzuron (75 %) kőrtében. Összefoglalva, megállapítható, hogy az „acetát pufferelt QuEChERS” megfelelő kinyerési hatásfokot biztosít a peszticidek széles skálájára nagy víztartalmú mintákban.

5.1.5.3 Kimutatási határ

A linearitás vizsgálatához alkalmazott kalibrációs tartomány alsó határa (5 ng/ml) a legtöbb esetben meghaladta a kimutatási határ koncentrációt. Ezért a kimutatási határértékek megállapításához sztenderd keverék oldatokat injektáltam 0,1-0,25-0,5 és 1 ng/ml koncentráció tartományban. Azt a koncentrációt, ahol a peszticidre jellemző mindkét átmenet kromatográfiás csúcsot eredményez úgy, hogy a jel/zaj arány minimum 3, fogadtam el kimutatási határértéknek. Ezek számszerű értékeit a **mellékletek / 4. táblázata** tartalmazza, eloszlásukat pedig a **10. ábrán** szemléltetem.



10. ábra Kimutatási határértékek eloszlása

5 µg/kg vagy ennél kisebb kimutatási határ jellemzi a vizsgált peszticidek több mint 90 %-át. A kimutatási határok mátrixok közti eltérésére az jellemző, hogy általában a mátrix nem, vagy csak csekély mértékben befolyásolja a kimutatási határt. Kivételek közé tartozik a teflubenzuron (1, 5 és 10 µg/kg) és a procymidone (5, 0,1, és 10 µg/kg) paradicsomban, körtében és narancsban detektálható legkisebb koncentrációja. Egyes peszticidek, mint a diazinon vagy a pirimiphos-methyl mindhárom mátrixban érzékenyek voltak (0,1 µg/kg). A mátrix jelentősen befolyásolta a clofentezine detektálását

narancsban és a fipronil-ét körtében (25 µg/kg). A kimutatási határt spinosyn D esetén csak egy detektált átmenet alapján volt mód megállapítani és bár a methomyl két átmenetét monitoroztam, az egyik átmenete nagyon érzéketlennek bizonyult, ezért az LOD meghatározásához ebben az esetben csak az intenzívebbet vettem figyelembe. 25 µg/kg kimutatási határt tapasztaltam fipronil és propargite esetén körtében, illetve clofentezine és propargite meghatározásakor narancsban. Az LOD a rájuk vonatkozó MRL értékeket csak a fipronil-körte pár esetén haladta meg.

Általánosságban kijelenthető, hogy a fejlesztett módszer alkalmas a vizsgált nagyszámú peszticid alacsony (ppb-s) koncentráció tartományban való meghatározására, tipikusan a rájuk meghatározott EU MRL értékek alatt.

5.1.5.4 Ismételhetőség

Öt párhuzamos mérést végeztem 10 és 100 ng/ml mátrix-illesztett sztenderd keverék oldatokból, majd az intenzitások relatív szórás értékei alapján állapítottam meg az ismételhetőséget. A 100 ng/kg koncentráció alapján a difenoconazole (mindhárom mátrixban), propamocarb (paradicsomban és körtében) és a propargite (paradicsomban) kivételével minden peszticid 20 %-nál kisebb relatív szórást mutatott. Ez összhangban van a SANCO rendelet által sokkomponenses módszerekre előírt maximum 20 % RSD határral. 10 ng/ml koncentráció esetén - ahogy az várható is volt -, több, számszerűen 15 peszticid mutatott 20 %-nál nagyobb - tipikusan 20-50 % -, szórást. Ez a következők: aclonifen, bendiocarb, carbaryl, clofenetezine, cyromazine, dicloran, fiprionil, fluroxypyr, indoxacarb, metobromuron, monolinuron, propargite, thiabendazole, thiamethoxam és XMC. A 10 ng/ml elég közel van az általános kimutatási határsávhoz, ezért ezzel magyarázható a nagyobb szórás. Az ismételhetőséget jobban jellemzi a 100 ng/ml koncentráció eredményei, miszerint a fejlesztett sokkomponenses módszer ismételhetősége a SANCO rendelet által támasztott kritériumoknak megfelel, robusztusság jellemző rá.

5.1.6 Valódi minták mérése

Az eredmények jelen fejezete az Almería-i Egyetemen, Spanyolországban készült, ezért a valódi minták az Andalúzia-i Monitorozási Program részét is képezték. Összesen 59 mintát vizsgáltam, melyeket helyi piacokról és áruházakból véletlenszerűen választottam. A minták mátrixukat tekintve igen változatosak: uborka, körte, alma, eper, mandarin, paprika, paradicsom, padlizsán, banán, nektarin, sárgadinnye, görögdinnye, citrom és kivi voltak. A mennyiségi meghatározást paradicsom, körte és narancs mátrixra-illesztett kalibrációval végeztem, minden mátrixot a hozzá legjobban hasonlító mátrix-illesztett kalibrációval hasonlítottam össze. (A SANCO rendelet ekkor még nem tartalmazta a mátrixok csoportosítását [**internet 5**], ezért ezt saját belátásom szerint tettem.) Ezek alapján az uborka, paprika, paradicsom és a padlizsán a „paradicsom-csoportba”; a banán, alma, eper, körte, nektarin, sárgadinnye, görögdinnye és kivi a „körte-csoportba”; míg a mandarin és a citrom a „narancs-csoportba” tartoztak. A banán kivételével minden mátrixot egyszerűen be lehetett sorolni a megfelelő csoportba. A banán nagy cukortartalma miatt a körtére hasonlít legjobban az általam kalibrációhoz használt mátrixok közül, de a nagy lipid és zsírtartalma miatt attól mégis jelentősen eltér. Praktikussági megfontolásból ebben a vizsgálatban mégis a „körte-csoportba” soroltam. (Ha azonban valamely peszticidet nem a saját mátrixára illesztett kalibrációval határérték közelében mér az analitikus, akkor érdemes a mérést immáron a saját mátrixra illesztett kalibrációval újra elvégezni.)

Az 59 vizsgált mintából 50 legalább egy peszticidre (a vizsgált 150-ből) pozitív volt, azaz mérhető koncentrációban tartalmazta az aktuális szert. A pozitív mintákban a 160 célpeszticid közül 33-at detektáltam. A mért koncentrációk tipikusan 100 µg/kg alatt voltak, kivéve az imazalil-t (1278 µg/kg) és a malathion-t (1021 µg/kg) egy-egy mandarin mintában, bár ezek még így sem lépték túl a rájuk meghatározott 5 illetve 7 mg/kg EU MRL értéket. Az imazalil és a malathion azért lehetett viszonylag nagy koncentrációban jelen a mandarin mintában, mert ezeket betakarítás utáni

kezelésre használják a termék hosszabb eltarthatósága érdekében. Az EU-ban betiltott növényvédőszerekre a vizsgált minták negatívak voltak.

5.1.7 Következtetések

A kidolgozott módszer teljesítmény jellemzőinek statisztikai jól mutatják, hogy a módszer alkalmas a kiválasztott 160 célpeszticid többségének zöldség és gyümölcs mintákból való mennyiségi mérésére. Az „acetát-pufferelt QuEChERS” minta-előkészítés robusztus, alkalmas kémiaiilag egymástól jelentősen különböző peszticidek kinyerésére úgy, hogy a ko-extrahálódó mátrixkomponensek nem jelentenek jelentős veszélyt a pontos mérésre. A mátrix hatás értékek alapján különbség figyelhető meg az egyes mátrixok közt, ami miatt (lehetőleg saját) mátrix-illesztett kalibráció alkalmazása szükséges. A műszer a komponensek többségére három nagyságrendnyi linearitást mutatott (5-500 µg/kg), ami sokkomponenses peszticid mérésekhez teljes mértékben elfogadható. Ha egy peszticid mintában mért koncentrációja meghaladja a lineáris tartományt, akkor a minta hígítása és újramérése erősen ajánlott a már nem lineáris összefüggés bizonytalanságának kiküszöbölésére. A 150-nél jóval több peszticid meghatározása az újgenerációs tömeg spektrométerekkel és HPLC pumpákkal, oszlopokkal (gyorsaság, hatékonyabb elválasztás) a közeljövőben technikailag megoldható lesz, a szűkebb keresztmetszetet mindig is a minta-előkészítés fogja jelenteni. A QuEChERS robusztussága és egyszerűsége miatt igen elterjedt lett az utóbbi években, de nehezen elképzelhető, hogy ez validálható nagyszámú, akár 500 peszticid egy műszeren történő együttes mérésére. Ezt alátámasztja, hogy a 160 peszticidből 10 érzéketlen volt, néhány továbbira pedig alacsony kinyerési hatásfok értéket produkált. Természetesen a QuEChERS-szel jól működő peszticidek száma jóval több, mert nem az összes létező LC-vel mérhető peszticidet vizsgáltam. A 150-nél lényegesen több peszticid együttes mennyiségi mérése azért is megkérdőjelezhető továbbá, mert bár a vizsgált kereskedelemből származó 59 minta nem ad reprezentatív eredményt, de hozzávetőlegesen informatív, hogy a 160 vizsgált komponens közel ötödét

(33-at) detektáltam. Továbbá, nem valószínű, hogy egy minta sokféle peszticiddel szennyezett, így a mennyiségi méréshez szükséges sztenderd keverék oldatok készítése feleslegesen megnövelt labormunkát igényel. A mintából nyerhető információ persze akkor komplexebb, ha minél több peszticidre terjed ki a fejlesztett módszer. Ez az ellentét irányozza elő véleményem szerint a pásztázó, úgynevezett „screening” módszerek létjogosultságát.

Összefoglalva, az „acetát-pufferelt QuEChERS” minta-előkészítés és az LC-MS/MS technika kapcsolása robusztus mennyiségi multikomponenses peszticid meghatározási módszerek létrehozását és fejlesztését teszi lehetővé, a jelen fejezetben vázoltak alapján pedig körvonalazódnak a meghatározás korlátai.

5.2 Mérési paraméterek hatásainak vizsgálata 150 peszticid meghatározhatóságára LC-MS/MS technikával

Ebben a fejezetben az előzőleg kidolgozott módszer kromatográfiás és tömegspektrometriás paramétereinek hatását vizsgáltam, melyek kiterjedtek:

- HPLC (5 μm szemcsenagyság) és UHPLC (1,8 μm szemcsenagyság) oszlopok összehasonlítására
- Ionizációt segítő anyagok: 0,1 % hangyasav; 5 mM ammónium-formiát és 5 mM ammónium-acetát összehasonlítására
- Az oszloptermosztálás hatásának vizsgálatára
- Sztenderd elegy oldatok összehasonlítására
- A mérést zavaró izobár átmenetek feltérképezésére.

5.2.1 Folyadékkromatográfia

5.2.1.1 HPLC oszlop 5 μm szemcsemérettel

5.2.1.1.1 Az ionizációt segítő anyagok hatása a retencióra

0,1 % hangyasavat, 5 mM ammónium-formiátot és 5 mM ammónium-acetátot a víz fázisba (eluensbe) adagolva vizsgáltam azok ionizációra gyakorolt hatását [KMELLÁR; 2010/Talanta]. Természetesen az eltérő ionizációt segítő anyagok megváltoztathatják egyes komponensek retencióját, ennél fogva a sokkomponenses módszerben a komponensek retenció szerinti eloszlását, ezért a módosítószerkehez más időablakokat kellett beállítanom (**mellékletek / 5. táblázat**). Az 5.1 fejezetben tárgyalt kromatográfiás oszlopot és gradiens programot alkalmaztam ennél a kísérletnél úgy, hogy 150 peszticidet tartalmazó 50 ng/ml koncentrációjú sztenderd keverék oldatot (acetonitril:víz 20:80) injektáltam.

Nem zárható ki, hogy az ionizációt módosítószerke hatására megváltoznak a detektálás optimális paraméterei. Ezért az 5.1 fejezetben már bemutatott módon, ammónium-formiáttal és ammónium-acetáttal is elvégeztem a

komponensek detektálásának optimalizálását, de a módosítószerk semmilyen különbséget nem produkáltak. Ez azt jelenti, hogy a hidrogén-addukt keletkezésétől kezdve, az ugyanúgy viselkedik, fragmentálódik függetlenül attól, hogy milyen módosítószer szolgált proton donorként. Ezért az esetleges intenzitásbeli különbségek a kvázi-molekulaionok intenzitásának különbségéből eredhetnek, természetesen a műszer konstans érzékenysége mellett. Ammónia-tartalmú módosítók alkalmazásával a hidrogén-adduktok ($[M+H]^+$) mellett az esetek egy részében megjelent az ammóniumion-addukt ($[M+NH_4]^+$), de mivel ezek intenzitása (a propargite-ot kivéve) kisebb volt, mint a hidrogén addukté, mindig ez utóbbit vettem figyelembe.

A csúcsok átlagosan 0,5 perc szélesek voltak, kiugró értéket a cambendazol (0,99 perc) és a cyromazine (0,26 perc) mutatott (**mellékletek / 5. táblázat**).

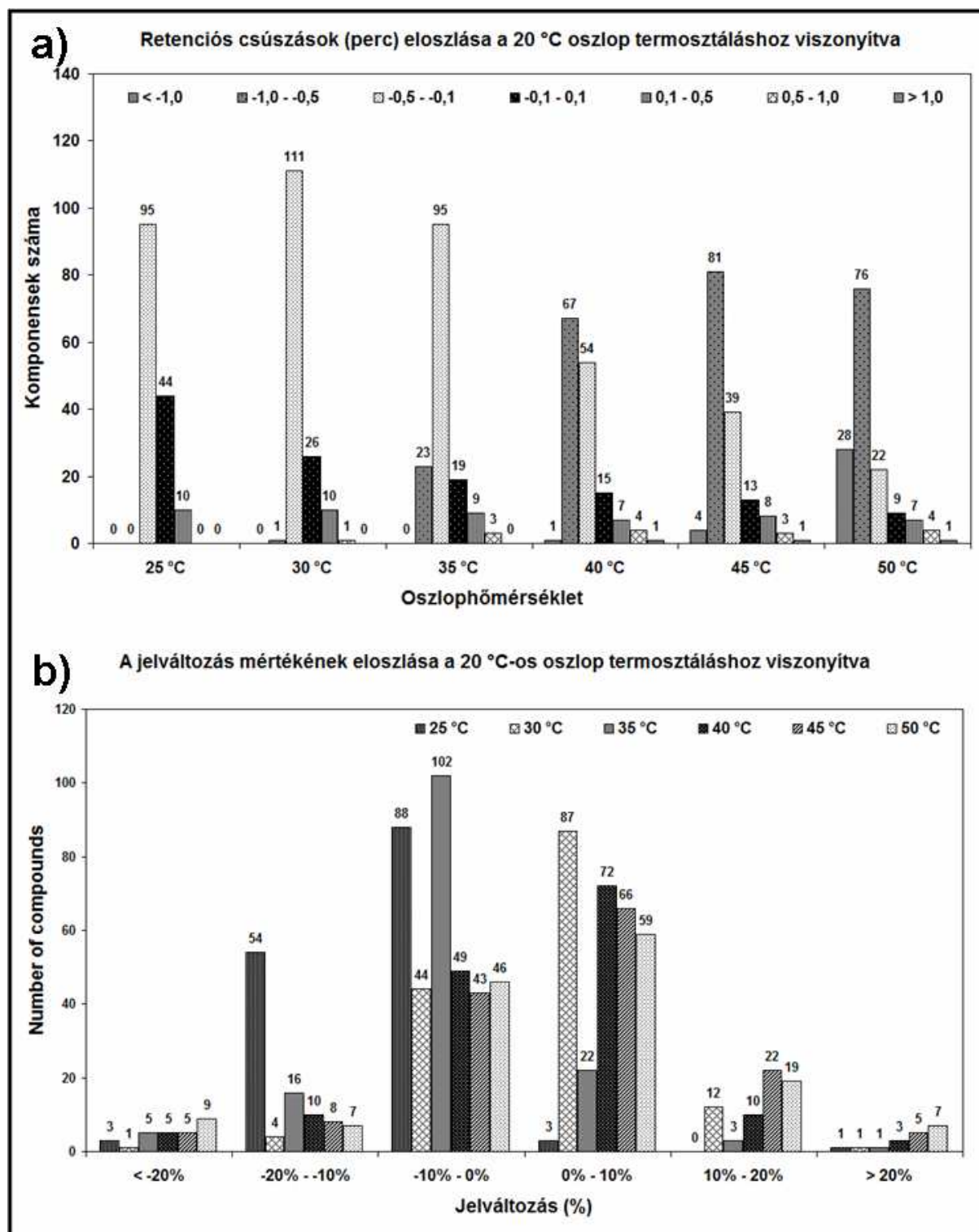
Az esetek 93 %-ában az ammónium-formiát és ammónium-acetát okozta retencióbeli csúszás a hangyasavhoz képest csak ± 1 perc volt, de jelentős retencióbeli változás ($<14,6$ perc) volt tapasztalható az emamectin benzoate, flzasulfuron, spinosyn A, spinosyn D, spiroxamine, thiabendazole és thiocyclam esetében (lásd **mellékletek / 5. táblázat**).

5.2.1.1.2 Az oszlop termosztálás hatása a retencióra és a csúcsterületekre

Az alkalmazott analitikai módszerek többsége esetén a folyadékkromatográfiás oszlop hőmérséklete szabályozott és valószínűleg nem ez a fő analitikai paraméter, ami a mérést befolyásolja, de fontos lehet a megfelelő csúcsalak eléréséhez.

Ezért a vizsgálatot a HPLC oszlopon végeztem, az oszlophőmérsékletet pedig 20, 25, 30, 35, 40, 45, és 50 °C-ra állítottam. A vizsgálat alatt 0,1 % hangyasav módosítót alkalmaztam a víz fázisban. Minden hőmérsékleten 5 injektálás átlagát hasonlítottam a 20 °C-ra kapott retenciókhoz. Általában magasabb oszlophőmérséklet korábbi elúciót eredményez. Ezeket a retenciós különbségeket hét csoportba soroltam: $[>-1,0$ perc]; $[-1,0; -0,5$ perc]; $[-0,5; -0,1$ perc]; $[-0,1; 0,1$ perc]; $[0,1; 0,5$ perc]; $[0,5; 1,0$ perc] és $[>1,0$ perc].

A retenciós különbségek hőmérséklettől való függését a **11/a ábrán** szemléltetem.



11. ábra Különböző oszlop termosztálási hőmérsékletek hatása a retencióra és az analitikai jelre

A retenciós különbségek bár változást mutatnak, ezek nem jelentősek. Fontosnak tartom kiemelni, hogy az oszlop termosztálása lényeges, ellenkező esetben az oszlophőmérséklete követi a laboratórium hőmérsékletét, ami

évszakonként változhat. Ilyen esetekben a módszer sztenderd kromatogramján (amihez a többi mérés kromatogramjait viszonyítjuk) a keresett komponensek eltérő retenciót mutathatnak, mint az utána pár hónappal mért mintában, ami szoftveres értékelésnél problémát, illetve hamis negatív eredményeket okozhat, ha az analitikus ezt figyelmen kívül hagyja.

Az oszlophőmérséklet csúcsterületre gyakorolt hatását is vizsgáltam (**11/b ábra**). Ahogy arra számítani is lehetett, a 20-50 °C tartományban a csúcsterületek csak kismértékű változást mutattak. Azért nem jelentős ez a hatás, mert ugyanazon minta többszöri injektálása is produkálhat ± 10 % szórást.

Véleményem szerint az indokolatlanul magas hőmérséklet használatának - mint amilyen az 50 °C -, nincs hozadéka, de a szobahőmérséklettől magasabb 30-35 °C oszlophőmérséklet alkalmazása optimális a reprodukálhatóság és a stabilitás érdekében.

5.2.1.2 UHPLC oszlop 1,8 μ m szemcsemérettel

A módszert a HPLC alkalmazásról UHPLC alkalmazásra kellett átültetnem. Az eltérő fizikai paraméterek (szemcsenagyság, oszlop átmérője és hossza; **lásd 4.2.1 fejezet**) eltérő kromatográfiás beállításokat követeltek. Az UHPLC oszlop specifikációjában 0,2-0,4 mL/perc-es áramlási sebességet javasolnak. A kezdeti eluens koncentráció (20 % acetonitril + 80 % víz) mellett 0,3 mL/perc áramlással már 330 bar nyomáson üzemeltethető, ami - bár az oszlop magasabb nyomást is tolerál (maximum 600 bar) -, a HPLC pumpa maximális nyomásához (400 bar) közelít.

(Napjainkban az UHPLC pumpák (>1000 bar) elterjedése növekszik, a laboratóriumok többsége, akik LC pumpával rendelkeznek, az általában HPLC pumpa. Ezen pumpák UHPLC oszlopokhoz (<2 μ m szemcsenagyság) történő használata egy alternatíva a hatékonyság növelésére.)

Az UHPLC oszlopra injektált mintamennyiséget 1-5 μ l-ben határozza meg a specifikáció. Ezért 1, 2 és 5 μ l mennyiséget injektáltam ugyanabból a mátrixszal terhelt sztenderd keverék oldatból és néhány peszticidre vizsgáltam a csúcsterületet és a csúcsalakot. Nyilvánvalóan az 5 μ l mennyiség adta a

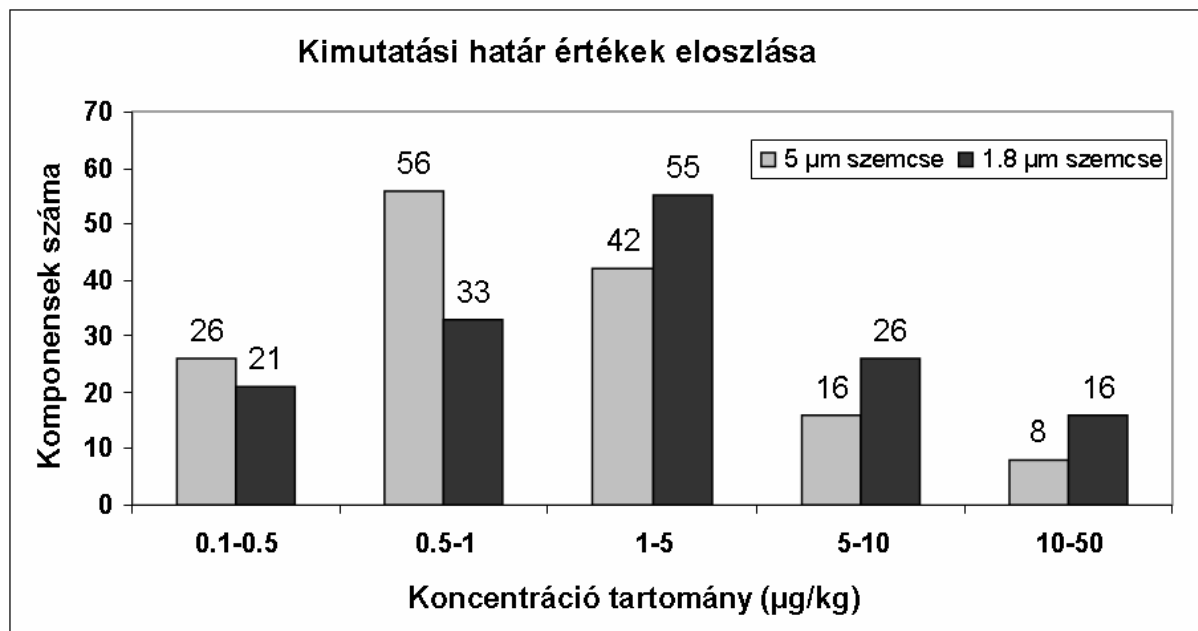
legintenzívebb jeleket, a kérdés csak az volt, hogy az így oszlopra juttatott mátrix zavarja-e a mérést. Mivel semelyik vizsgált peszticid esetén sem lépett fel zavarás, ezért az 5 µl mennyiséget választottam optimálisnak. Az UHPLC alkalmazáshoz az oszlop kis szemcsenagysága miatt, a mintákat injektálás előtt a HPLC-től eltérően 0,45 helyett 0,22 µm pórusátmérőjű szűrőn kellett szűrni.

A legjelentősebb előnye az UHPLC-nek a HPLC oszlopokhoz képest, hogy a kisebb szemcsenagyság miatt csökken a kromatográfiás futtatási idő. A futtatási idő optimalizálásához 20 peszticidet választottam ki (a 150-ből) a HPLC-s módszerből a retenciók alapján a kromatogram minden részéről. A HPLC módszer gradiens programjához hasonló, de gyorsabb gradienseket teszteltem, melyek futtatási ideje 33, 20, 15 és 12 perc volt. A 12 és 15 perces módszer esetében a nagyon apoláros komponensek nem eluálódtak az oszlopról. A 20 perces futtatási program már elegendőnek bizonyult, hogy az összes vizsgált komponens eluálódjon. Ez után a 150 peszticidet tartalmazó mix oldatot többször injektáltam, hogy retenciójukat vizsgáljam, majd ezek alapján sorba rendezve megállapítottam az időablakokat és véglegesítettem a módszert. Az UHPLC módszert alkalmazva a komponensek csúcs-szélességei a HPLC-hez képest jelentősen csökkentek: 0,17 perc (cyromazine) és 0,53 perc (DEET) között alakultak, a 150 peszticidre átlagosan 0,30 perc volt.

A hangyasav volt az egyetlen ionizációt módosítószer, amit UHPLC esetén alkalmazni tudtam. Az ammónia-tartalmú módosítók ugyanis olyan mértékben megnövelték az oszlop háttérnyomását, hogy azt csak <0,1 ml/perc áramlás mellett lehetett volna használni. Ez nyilvánvalóan a futtatási idő növelését eredményezi és ezzel együtt el is veszik az UHPLC előnye a HPLC-hez képest. Ezért a módosítószerek összehasonlítását HPLC pumpa használatával nem tudtam tanulmányozni, ez azonban nem jelenti azt, hogy ammónia-tartalmú módosítók nem működhetnek UHPLC pumpával (melyekkel nagyobb nyomás (>1000 bar) biztosítható), de ezt UHPLC pumpa hiányában nem vizsgáltam.

Az UHPLC oszlopra injektált minta mennyisége (5 µl) fele a HPLC-re juttatott mennyiségnek (10 µl). Mindkét módszer érzékenységét vizsgáltam paradicsom mátrixban és azt tapasztaltam, hogy a kimutatási határértékek a komponensek 75 %-ánál csak kismértékben (átlagosan $\pm 0,15$ ng/ml)

különböztek, tehát ez nem követte a mintamennyiségek különbségét. Ennek oka nyilvánvalóan a hatékonyabb elválasztásból eredő keskenyebb csúcsok. A **12. ábra** mutatja a kimutatási határértékek eloszlását a két oszlop esetén.



12. ábra Kimutatási határértékek eloszlása a vizsgált peszticidekre, 5 (HPLC) és 1,8 µm (UHPLC) szemcsenagyságú oszlopokat alkalmazva

A kismértékű eltérés a két oszlop között megfigyelhető, és ami lényeges, hogy a peszticidek több mint 90 %-a 10 µg/kg-nál kisebb koncentrációban is mérhető. Ez azért fontos, mert az európai szabályozás 10 vagy ennél nagyobb határértéket határoz meg, az ennél kisebb koncentráció mérése pedig a rendszer hatékonyságát és megfelelőségét bizonyítja.

A **mellékletek / 3. ábra** a methoxyfenozide példáját szemlélteti paradicsom extraktumban.

Amellett, hogy a futtatási idő 45 percről (HPLC) 20 percre csökkent (UHPLC), az UHPLC-vel mért methoxyfenozide területe nagyjából fele a HPLC-vel mértének, de a keskenyebb csúcs miatt a Jel/Zaj arány sokkal jobb UHPLC alkalmazásakor, ami hasonlóan alacsony kimutatási határokat eredményez.

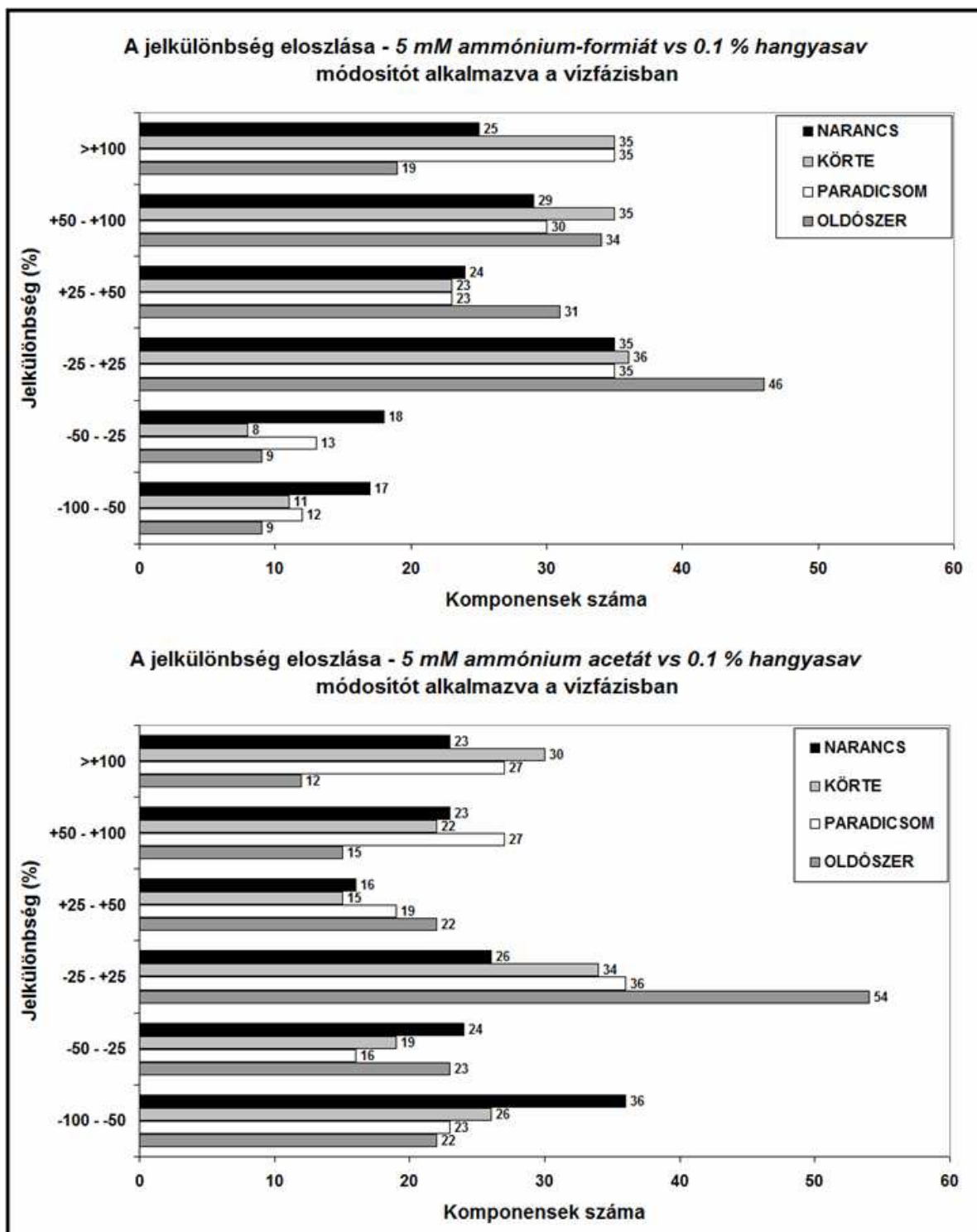
5.2.2 Tömegspektrometria

A komponensek detektálásának optimalítása és a mérési paramétereket az 5.1 fejezet tartalmazza.

5.2.2.1 Az ionizációt segítő anyagok hatása az ionizációra

A peszticideket 50 µg/kg koncentrációban paradicsom, körte és narancs mintákban, valamint tiszta oldószerben vizsgáltam az ionizációt módosítószerekkel. Az ammónia-tartalmú módosítók használatával kapott jel intenzitásokat a hangyasav-módosítóra kapott jelekhez viszonyítottam. A százalékban kifejezett különbségek eloszlását a **13. ábrán** szemléltetem.

Az ammónium-formiát a komponensek 75 %-ánál megnövelte az analitikai jelet, a mátrixok között csekély különbség figyelhető meg. Fontos megjegyezni, hogy jelentős jelerősödés (>100 %) figyelhető meg acetamiprid, carbaryl, thiacloprid és thiamethoxam esetén az összes vizsgált mátrixban és oldószerben; fenoxycarb-ra és fenbucarb-ra pedig csak körtében. Ezzel szemben extrém jelcsökkenést (<50 %) tapasztaltam butocarboxin, aldicarb, kresoxim-methyl, thiocyclam és diflubenzuron esetén mátrixtól függetlenül.



13. ábra A jel különbségek eloszlása eltérő ionizációt módosító segédanyagok használatával

A jelerősödés ammónium-acetát esetében is megfigyelhető. Jelentős erősödés (>100 %) tapasztalható butoxycarboxim, emamectin benzoate és prometryn esetén mátrixokban és oldószerben, míg az indoxacarb csak

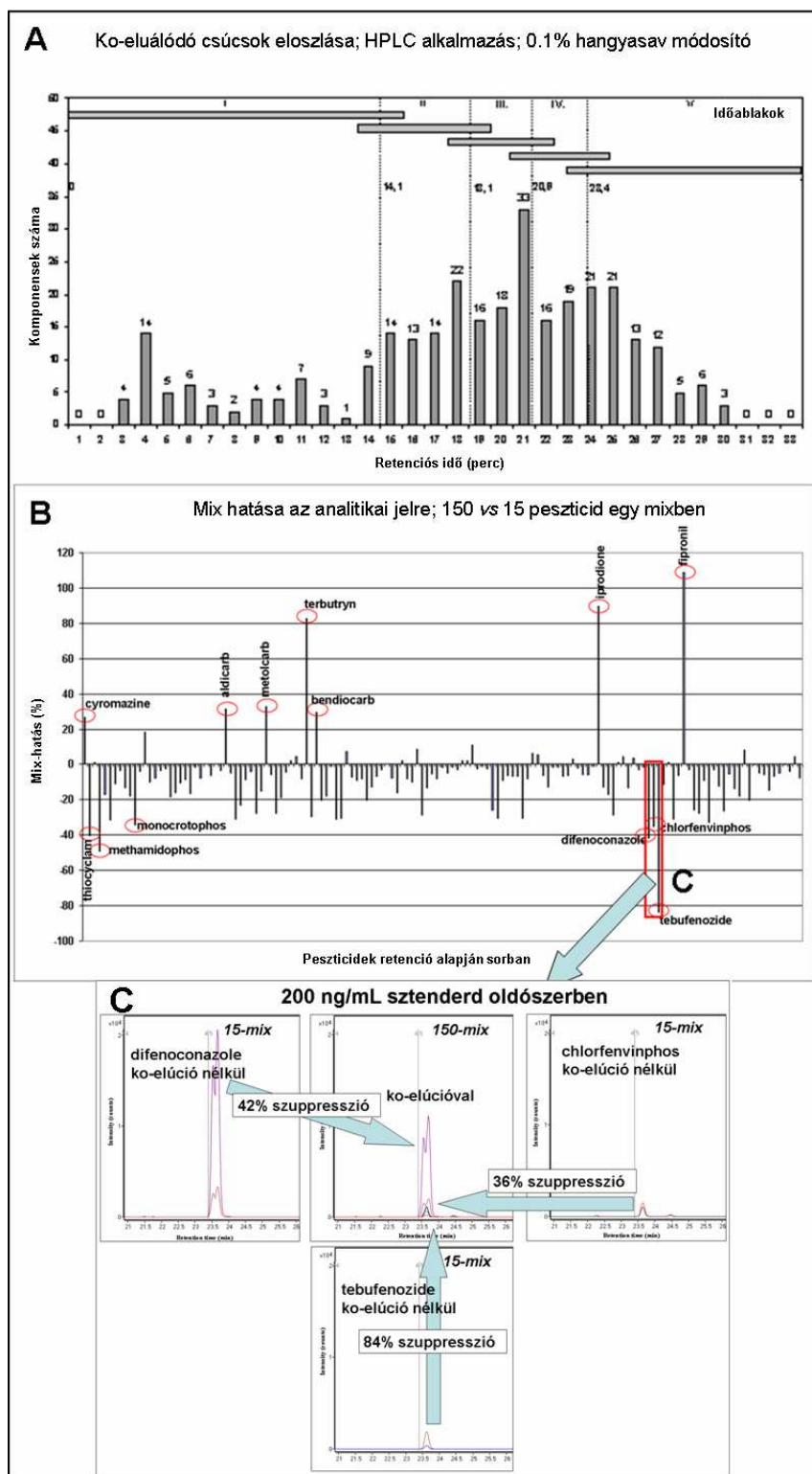
mátrixokban viselkedett így. A diazinon, fluometuron, metolcarb és difenoconazole jele pedig jelentősen csökken (<50 %) ammónium-acetát hatására. A **13. ábra** eloszlás diagramjából látható, hogy világos különbség van ammónium-formiát és ammónium-acetát módosítók hatása között: ammónium-formiát hatására több peszticid mutatott >25 % jelerősödést, mint ammónium-acetát hatására. A mátrixok között nincs jelentős különbség, az egyetlen lényeges, hogy a narancs-mátrixban több peszticid jele csökken ammónia tartalmú módosítókkal, mint más mátrixokban [ANASTASSIADES; 2003].

Bár az ammónia-tartalmú módosítók hatására sok peszticid válaszjele megnő, néhány jele pedig jelentősen csökken. Ha figyelembe vesszük, hogy hangyasav módosítóval a vizsgált peszticidek 90 %-ánál megfelelően alacsony (<10 µg/kg) kimutatási határt lehet elérni, a jelerősödési hatás a kimutatási határ további csökkenését eredményezi, ami pozitívum, de nem feltétlen szükséges. Ezzel szemben egyes peszticidek jelentős jelcsökkenése (<50 %) a kimutatási határt akár 5-10-szeresére emeli, ami nemkívánatos negatívum. Az általam vizsgált 150 peszticid statisztikája alapján a hangyasav módosítót találtam az optimálisnak a sokkomponenses módszerek esetében [KMELLÁR; 2008].

5.2.2.2 A sztenderd keverék oldatok hatásai a meghatározásra

Frissen készített 1 darab 150 és 10 darab egyenként 15 peszticidet tartalmazó sztenderd keverék oldatot mértem (200 ng/ml koncentráció) és összehasonlítottam a komponensekre kapott válaszjeleket. A 15 peszticidet tartalmazó mixeket úgy állítottam össze, hogy futtatáskor ne álljon fenn ko-elúció peszticidek között, míg a 150 komponenst tartalmazó mixben nyilvánvalóan volt ko-elúció. A 150 és a 15 komponenses mixek futtatásakor kapott intenzitások eltérése a ko-elúció miatti ionizációs hatást feltételezi.

A mellékletekben található **14/A ábrán** jól látható, hogy a ko-elúció főleg a kromatogram második felében áll fenn, ezért a lehetséges ko-elúciós hatásra itt számítottam. Ezzel szemben azt tapasztaltam, hogy a hatás nem elsősorban ko-elúció, hanem komponensfüggő is, ami jól kitűnik a **14/B ábráról**.



14. ábra Nagyszámú peszticidet tartalmazó keverékben a ko-elúció miatt tapasztalható jelváltozás.

A, A kromatogram egyperces szeleteiben tapasztalható ko-elúció eloszlása

B, A hatás főleg szuppresszió, valószínűsíthetően az ionforrásban történő verseny-hatás miatt (néhány kiugró eredményt kiemeltem)

C, Példa a ko-elúció miatti együttes szuppresszió jelenségére.

Ezen néhány kiugró eredményt jelöltem is. Érdekes, hogy az együtt eluálódó peszticidek az ionforrásban egymás ionizációját negatívan befolyásolják annak ellenére, hogy az ionizációt segítő anyagok nagyságrendekkel több protont adnak a mindenkori rendszerbe, és a protonfelesleg miatt a negatív hatás nem lenne indokolt. A **14/C ábra** egy ilyen példát szemléltet.

A difenoconazole, chlorfenvinphos és a tebufenozide is jelcsökkenést mutat, ha együtt eluálódnak. A ko-elúció miatt extrém jelváltozást mutató peszticidek mérési hibát eredményezhetnek. Ha például egy sok komponens tartalmazó sztenderd keverékoldattal kalibrál az analitikus ahol ez a ko-elúciós hatás fennáll, de a mintában általában csak egy vagy pár peszticid van egyszerre jelen, ami kisebb valószínűséggel jelent ko-elúciót, akkor jelcsökkentő hatás miatt a kalibrációs egyenes meredeksége (indokolatlanul) csökken és a valós értéknél nagyobb koncentrációt határoz meg az analitikus. Jelerősítő hatás esetén ez épp fordítva van. Bár a SANCO rendelet erről nem rendelkezik, véleményem szerint a határérték közelében mért mintát érdemes az előzetesen detektált peszticiddel (immáron a ko-elúció lehetőségének teljes kizárásával) újrakalibrálni.

5.2.2.3 Izobár átmenetek

A komponensek azonosítására MS/MS detektálás esetén két átmenetet kell monitorozni a SANCO rendelet alapján. Az MS/MS előnye az MS detektáláshoz képest, hogy a kevésbé specifikus kvázi-molekulaion helyett (ami egyébként sokkal specifikusabb, mint egyéb detektálási formák), az abból keletkező, sokkal specifikusabb fragmens iont pásztázzuk. A detektált átmenet ezért az esetek nagytöbbségében kizárólag a célmolekulát jellemzik. Nem zárható ki azonban az izobár átmenetek jelenléte, kifejezetten sokkomponenses módszerek esetében.

Figyelembe véve, hogy

- 1) a hangyasav a leggyakrabban alkalmazott módosítószer;
- 2) az ammóniumion-addukt nem gyakori, még akkor sem, ha ammónia-tartalmú módosítót használunk;

3) az esetlegesen keletkező nátrium-addukt ($[M+Na]^+$) a nátriumot veszti el fragmentáció során a töltéssel együtt, kivéve néhány N-methylcarbamate peszticidet [GOTO, 2003]; ezért az izobár átmenetek feltérképezéséhez csak hidrogén adduktokat és az ezekből keletkező fragmenseket használtam.

Az izobár átmeneteket véleményem szerint három csoportba lehet sorolni:

- i) Két célmolekula detektált átmenete izobár: ha ezek a molekulák ko-eluálódnak, akkor az azonosításra a másik átmenetük szolgál.
- ii) Két célmolekula detektált és nem detektált átmenetei azonosak: ha ezek a komponensek ko-elúcióban állnak, akkor a nem detektált átmenet meg tudja emelni a detektált átmenet válaszjelét anélkül, hogy egyéb látható jele lenne. Ezzel eltolja a zavart molekula átmenet intenzitásainak arányát, ami szintén az azonosítás alapja. Ha ez előrejelezhető, akkor ezt az arányt figyelmen kívül kell hagyni.
- iii) Két célkomponens nem detektált átmenetei azonosak: ennek az eshetőségnek nincs analitikai jelentősége, mert ezen átmenet a háttérben marad és nem befolyásolja az analitikai mérést.

A 150 vizsgált peszticidből ezért kiválasztottam azokat, amelyek ugyanolyan tömegű kvázi-molekulaionnal rendelkeznek, mert ezeknek lehet izobár átmenetük. A 32 csoport nagy részénél nem volt izobár átmenet, azt a néhány csoportot ahol viszont ez fennállt, a **mellékletek / 6. táblázatában** foglaltam össze.

A butocarboxim-aldicarb sulfone és a cyprodinil-methiocarb párok az (ii) csoportba tartoznak, de mivel nem ko-eluálódnak, nem jelentenek analitikai problémát sem. Bár a propazine-terbuthylazine pár 1-1 átmenete és a diuron-fluometuron pár mindkét átmenete izobár, szintén nem állnak ko-elúcióban, ezért ez sem jelentett problémát. A prometryn-terbutryn pár ko-elúcióban áll, az izobár átmenetük (242.0/158.0) mellett a nem detektált fragmensek (91.0, illetve 109.0 és 68.0) intenzitása nagyon alacsony, ami miatt azonosításuk csak egy átmenet alapján lehetséges alacsony koncentrációban. Természetesen az azonosításhoz az átmenetek arányát nem szabad figyelembe venni.

5.2.3 Következtetések

A hangyasav, ammonium-formiát és ammonium-acetate ionizációt módosítók megfelelnek a sokkomponenses peszticid módszerekhez, bár az ammónia-tartalmú szerek növelik sok peszticid jelének intenzitását, néhányét drasztikusan csökkentik. Ezen kívül a hangyasavval elért kimutatási határértékek az EU MRL értékekkel összhangban vannak - általában az MRL alatti értékek -, ami miatt a hangyasav egy optimális választás ESI+ módot alkalmazva.

Az oszlophőmérséklet változtatásának nincs jelentős befolyása az analitikai jelre és a retenciós időre is csak kis változásokat eredményezett.

A kis szemcsenagyság (1,8 μm) és a gyors gradiens program felére csökkentette (~15 perc helyett ~30 perc) a 150 peszticid meghatározását a HPLC alkalmazáshoz képest (a teljes futtatási idő 45 percről 20 percre csökkent).

Az izobár átmenetek problémája a célkomponensek optimálási adataiból prognosztizálható. Peszticid-peszticid vagy peszticid-mátrix izobár átmenetek jelenlétekor egy harmadik átmenet monitorozása célravezető.

Közepes és sok komponenses sztenderd keverék oldatok használata egyes ko-elúcióra érzékeny peszticidekre az ESI forrásban autoszuppresszív hatást okozhat, ezért az analitikusnak ezekre kiemelten kell figyelnie.

5.3 Két módszer fejlesztése és kombinálása 300 peszticid minőségi és mennyiségi meghatározására LC-MS/MS technikával

5.3.1 LC-MS paraméterek

A folyadékkromatográfiás elválasztáshoz az **5.1.2 fejezetben** leírt HPLC rendszert és oszlopot alkalmaztam változatlan oldószer összetétellel és gradiens programmal.

A peszticidek tömegspektrometriás detektálására Applied Biosystems 3200 QTRAP LC/MS készüléket alkalmaztam, melyhez turboV® ionforrás csatlakozik, amit ESI+ módban üzemeltettem. Optimáláshoz teljes pásztázási (full scan), méréshez pedig EPI és MRM módot alkalmaztam (lásd a **4.2.1 fejezetben**). A 300 peszticid minőségi (EPI módszer) és 55 peszticid mennyiségi (MRM módszer) meghatározásához alkalmazott ionforrás-paraméterek ilyen sorrendben a következők. Fügőny gáz (curtain gas) áram 20 és 10 psi; ütközési gáz (collision gas) 12 és 5 egység; ionforrás feszültsége (ion spray voltage) 5000 és 5500 V; hőmérséklet mindkét módszerben 450 °C; ionforrás gáz1 árama 40 és 50 psi; ionforrás gáz2 árama mindkét módszerben 50 psi és egy átmenet pásztázási ideje 5 és 15 ezredmásodperc. Az EPI pásztázó módszerben az összehasonlítás érdekében, a műszergyártó javaslata alapján 20, 35 és 50 V ütközési energiát alkalmaztam, mert a spektrumkönyvtárat is ilyen beállítások mellett alkották.

Az Applied Biosystems Analyst 1.4.2 verziószámú szoftvert alkalmaztam a mérés kontrollálására, adatrögzítésre és azok kiértékelésére. A 300 peszticid meghatározására az Applied Biosystems által vízminták mérésére fejlesztett pásztázó (EPI) módszert és az ahhoz tartozó spektrumkönyvtárat alkalmaztam [Applied Biosystems Application Note 114AP38-02, 2005: **internet 12**].

5.3.2 Minta-előkészítés

A 2.3.2.3 fejezetben részletezett „acetát-pufferelt QuEChERS” minta-előkészítési módszert alkalmaztam. A mintatisztítás után nyert acetonitriles felülúszóból 800 µl-t mértem 2 ml-es mintatartó üvegcsébe, nitrogénáram alatt szobahőmérsékleten szárazra pároltam, majd 20 % (160 µl) acetonitril + 80 % (640 µl) víz adagolásával újra oldottam és injektálás előtt 0,45 µm PTFE szűrőn (13 mm átmérő) szűrtem. A mintát először EPI módszerrel mértem és opcionálisan (pozitív találat esetén) MRM módszerrel is. Ez utóbbihoz sztenderd addíciós kalibrációt alkalmaztam, melynek pontjait a következőképpen állítottam össze. A már lemért mintából 4×80 µl-t mértem 2 ml-es mintatartó üvegcsébe illeszthető szűkítő csövekbe, majd ezekre 20 µl mennyiségű és 0; 250; 500 és 1250 ng/ml koncentrációjú sztenderd keverék oldatokat (acetonitril:víz 25:75) adagoltam, amely így 100-100 µl mennyiségű, egyenként 0; 50; 100 és 250 ng/ml koncentrációjú sztenderd addíciós pontokat eredményezett.

5.3.3 Minőségi és mennyiségi módszerek kombinálásának koncepciója

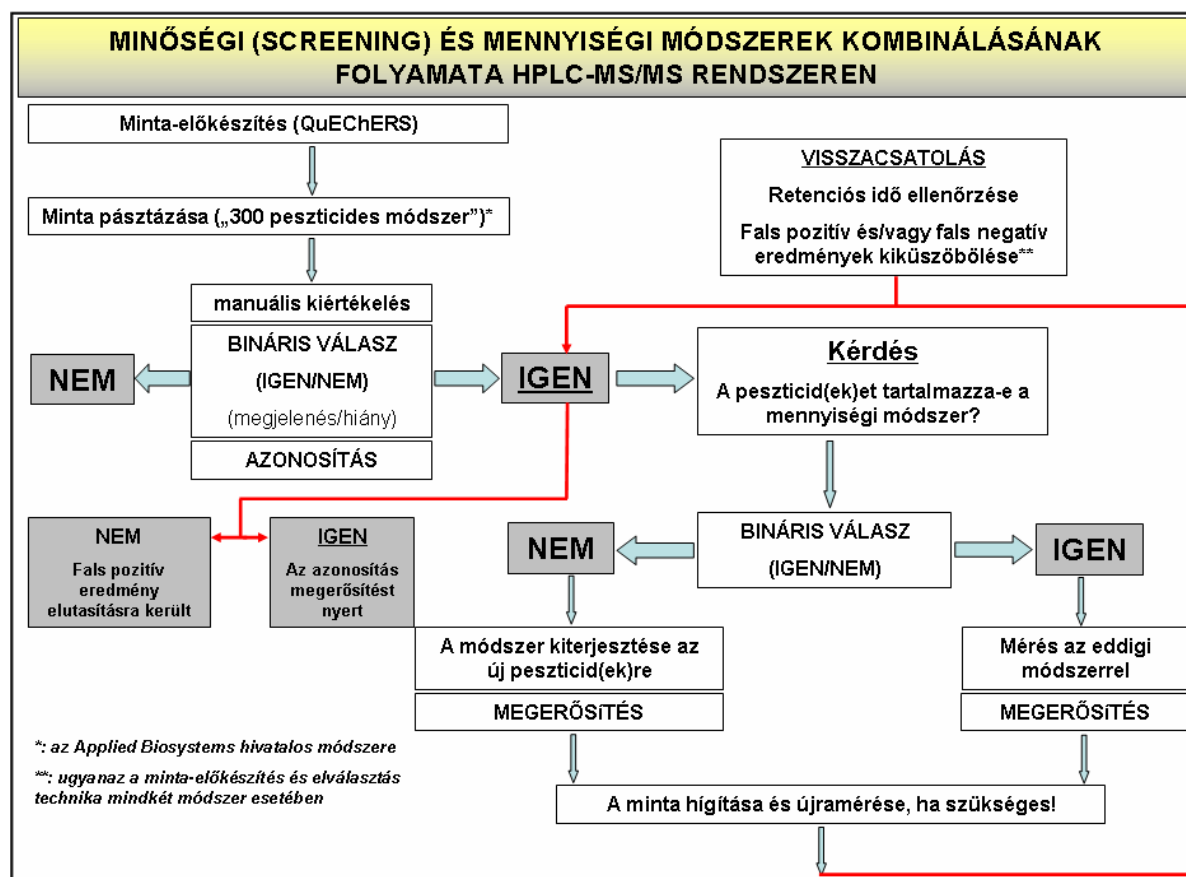
Mint ahogy azt az **5.1.7 fejezetben** kifejtettem, a pásztázási módszereknek létjogosultsága van a sokkomponenses peszticid analitikában. Ezek kivitelezésére elsősorban a TOF műszerek felelnek meg a nagy tömegpontosságuk miatt, de egyes gyártók tandem MS készülékei is képesek spektrumkönyvtárból való azonosításra. Az Applied Biosystems 3200 QTRAP LC/MS készüléke képes erre azzal együtt, hogy elsősorban MS/MS detektálásra használatos a peszticid analitikai területen. Adott volt ezért a lehetőség, hogy egyazon műszeren egy pásztázó és egy mennyiségi módszert kombináljak, teszteljek és annak előnyeire és hátrányaira rámutassak. A két módszer, amiket részben fejlesztettem és kombináltam a következők:

- (i) 300 peszticid minőségi azonosítása a rájuk jellemző átmenetek intenzitásától függően (IDA=Information Dependent

Analysis=információfüggő analízis) felvett EPI spektrumok és meglévő spektrumkönyvtár összehasonlítása alapján

- (ii) Az előzetesen detektált és/vagy gyakran alkalmazott (statisztikák alapján) peszticidek mennyiségi mérése, mely az első módszer találatainak megerősítése is egyben. Ebbe a módszerbe 55 peszticidet foglaltam, de tetszőlegesen bővíthető.

Az analízis folyamatát a **15. ábrán** szemléltetem.



15. ábra Pásztázó („EPI screening”) és mennyiségi (MRM) módszerek kombinálásának folyamatábrája HPLC-MS/MS rendszeren [KMELLÁR, 2010/Food Additives and Contaminants]

A folyamat lépései a következők:

1. Az „acetát-pufferelt QuEChERS”-szel (AOAC Official Method 2007.01) előkészített mintákat az „EPI screening” módszerrel mérem, ami 45 percet

vesz igénybe. Ezt a kromatogram manuális értékelése követi, amely a tapasztalatok alapján 5-10 percig tart.

2. Ha egyetlen pozitív találat sincs, akkor további mérés nem szükséges.
3. Ha a fejlesztett MRM módszer 55 komponense közül egyet is detektált az „EPI screening” módszer, akkor a mintát és annak sztenderd addíciós mintáit újra kell mérni az MRM módszerrel. Ez 4×45 percet, azaz 3 órát vesz igénybe.
4. Az MRM módszerrel megerősíthető az „EPI screening” eredménye, vagy téves pozitív esetén visszautasításra kerül.
5. Ha az „EPI screening” által detektált peszticid nincs benne az „MRM módszer” célkomponensei között, akkor az új komponens sztenderdjét be kell szerezni, meghatározni az optimális (ESI+) detektálási paramétereit és a módszerbe integrálni. Ily módon az „MRM módszer” célkomponenseinek száma idővel szükségszerűen bővíthet.

Mivel a két módszer ugyanazt az elválasztás-technikát alkalmazza, ezért a komponensek retenciójának és csúcsalakjának meg kell egyezniük. Nem egyezés esetén a pozitív találat elutasításra kerül. Az MRM módszerrel egy komponensről mért két átmenet által rajzolt csúcsok területének aránya (SRM arány) hasonló kell, hogy legyen a mintában és a sztenderdben is, valamint egy peszticid csak akkor mérhető mennyiségileg, ha mindkét átmenetének csúcsára fennáll, hogy a jel/zaj (S/N) aránya >10 .

A mennyiségi meghatározáshoz azért döntöttem sztenderd addíciós kalibráció mellett, mert

- (i) a mátrix-illesztett kalibrációhoz vak-mátrixot kell alkalmazni, ami figyelembe véve, hogy az MRM módszerrel 55 peszticidet mérek egyszerre, nem mindig megoldható,
- (ii) a mátrixhatást nem lehet jobban figyelembe venni, mint a saját mátrixra illesztett kalibrációval

és

- (iii) mindig adott volt a kalibrációs egyenes felvételéhez szükséges mintamennyiség ugyanabból a mintából, amit már egyszer mértem az „EPI screening” módszerrel.

A mintákat, ha azok olyan koncentrációban tartalmaztak peszticidet (tapasztalataim alapján ez 200-500 ng/ml), hogy a legnagyobb +250 ng/ml addíciós ponttal a koncentráció már kilépett a lineáris tartományból, akkor az eredeti extraktumot 5-10-szeresére kellett hígítani, újra addíciónálni és újramérni.

5.3.4 300 peszticid minőségi azonosítása (EPI „screening” módszer)

5.3.4.1 A módszer jellemzői

Az „EPI screening” módszer lényege, hogy egy komponensről csak egy (általában a legérzékenyebb) SRM átmenetet monitoroz, ami 300 átmenetet jelent 300 komponens esetében. A legkisebb 5 ezredmásodperc pásztázási idő (+2 ezredmásodperc megszakítási idő) esetén is egy ciklus $300 \times (5+2)$, azaz 2100 ezredmásodperc, azaz 2,1 másodperc, amivel még információvesztés nélkül határozhatóak meg a kromatográfiás csúcsok. (A műszergyártó legújabb generációs műszere (Applied Biosystems QTRAP 5500 LC/MS) már 2 ezredmásodperc/átmenet sebességgel pásztáz, ami átértelmezi ezt a 300-as határt.)

Ha egy pásztázott átmenet átlép egy, az analitikus által szoftveresen beállított alapintenzitást (amit jelen módszerben 500 cps-ben határoztam meg), akkor a műszer (csak) a kvázi-molekulaiont engedi az ütközési cellába és 20, 35 és 50 V ütközési energiát közöl vele. Ennek hatására a kvázi-molekulaiont fragmensekre szakad, és az energia mértékétől függően ez a molekulára jellemző 3 eltérő fragmentációs képet, mint ujjlenyomatot ad. Ez a pásztázási mód az úgynevezett EPI (Enhanced Product Ion scan= megerősített termékion pásztázás) mód. Magát a folyamatot a műszergyártó IDA-nak (Information

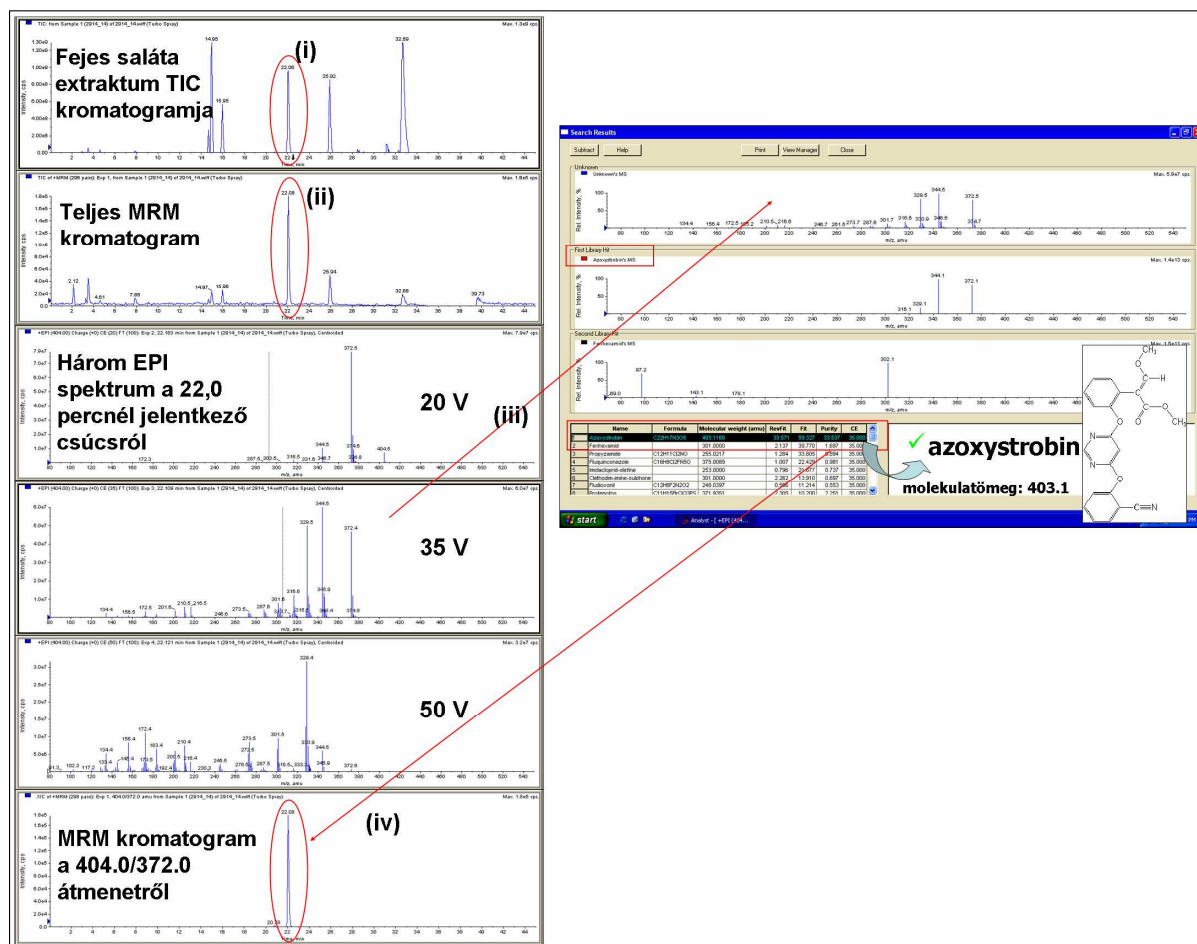
Dependent Analysis=információfüggő analízis) nevezte el, más műszergyártó saját műszereiken ezt DDS-nek (data dependent scanning=adatfüggő pásztázás) nevezik.

A teljes ionáram (TIC) kromatogram a 300 átmenet és - ha azok valamelyike átlépte a küszöbértéket -, az EPI spektrumuk intenzitását együtt tartalmazza.

Az EPI módszer előnye, hogy az EPI spektrumok könyvtárból való azonosítását a szoftver automatikusan végzi. A TIC kromatogramból a peszticid csúcsok keresését és az azonosított spektrumok helyességét az analitikus manuálisan végzi és dönt, hogy elfogadja-e a szoftver által kínált találatot vagy sem. Véleményem szerint néhány kritériumnak együttesen kell teljesülnie a peszticidek azonosításához, melyek a következők:

1. A TIC kromatogram egy csúcsát egy (lehetőleg) karakterisztikus átmenet hozza létre. Ezt az átmenet extrahálva a TIC kromatogramból, ugyanannál a retenciónál ad csúcsot ahol a TIC kromatogramból származott. Ez azért fontos, mert az egész kromatogramon folyamatosan jelen levő nagy intenzitású átmenet (mátrixból vagy egyéb szennyezésből eredő háttér) is okozhat a TIC kromatogramon karakterisztikus csúcsot, ami így nem valódi csúcsot takar.
2. a három különböző ütközési energián felvett spektrumoknak meg kell egyezniük a spektrumkönyvtárban szereplő spektrumokkal.
3. ha a könyvtárból azonosított peszticid molekula tömege $[M]$, akkor a kvázi-molekulaion tömege - amiből az EPI spektrumok származtak -, $M+1$ ($[M+H]^+$, azaz hidrogén addukt) vagy ritkábban $M+18$ ($[M+NH_4]^+$, azaz ammóniumion-addukt) kell, hogy legyen.

A gyakorlatban majdnem minden esetben hidrogén-adduktok keletkeznek. Az azonosítási folyamatot egy gyakorlati példán keresztül (azoxystrobin meghatározása fejes saláta extraktumban) az **16. ábrán** szemléltetem.



16. ábra Példa az azonosításra: egy fejes saláta extraktum kromatogramján 22,0 percnél jelentkező csúcs azonosítása

Ahogy látható, a TIC kromatogramon (i) a 22,0 percnél eluálódó csúcsot választottam ki azonosításra (minden egyes csúccsal így kell eljárni). Ebből előhívható a 300 peszticid teljes MRM kromatogramja (ii), ahol azonos retencióval szintén megjelenik egy csúcs. A TIC kromatogram csúcsából az annál a retenciónál megjelenő legintenzívebb átmenet kvázi-molekulaionjából a három különböző ütközési energiával felvett EPI spektrum hívható elő (iii). Ezen észlelhető, hogy az ütközési energia emelésével kisebb tömegű fragmensek keletkeznek, ami logikus is. Úgy tűnik, hogy a 20 V alkalmazásakor megjelenő m/z 404.5 tömegű ion a kvázi-molekulaion. A 35 és 50 V esetén már ez az ion eltűnik, miközben kisebb tömegű ionok (valószínűsíthetően ennek a fragmensei) megjelennek. Jelen ábrán csak a 35 V mellett felvett EPI spektrum kiértékelését jelenítettem meg, de mindhárommal el kell végezni a pozitív találat alátámasztására. Ha

mindhárom teljesül, akkor az utolsó biztosítási pontként össze kell hasonlítani a pozitív találat molekula tömegét és a TIC kromatogram vizsgált csúcsára vonatkozó legjellemzőbb átmenet kvázi-molekulaionját, mert ezeknek össze kell függeniük. Az **16. ábrán** szemléltetve az azoxystrobin tömege 403.0, míg a TIC kromatogram 22,0 percnél megjelenő csúcsából előhívott legjellemzőbb átmenet a 404.0/372.0 (iv). Ez a pozitív találatot alátámasztja, mert az átmenet kvázi-molekulaionja 404.0, ami az azonosított azoxystrobin tömegénél egyel nagyobb, ezért ennek a hidrogén-adduktjáról van szó.

A szoftver automatikus keresési funkciója, annak metodikája is magyarázatra szorul. Ez a lehetséges pozitív találatokat jeleníti meg, melyeket sorba lehet rendezni név, molekula tömeg, illeszkedés (fit), fordított illeszkedés (reverse fit), tisztaság (purity) és ütközési energia (collision energy) szerint. Az ütközési energia a spektrumhoz kapcsolódó fix információ, csak tájékoztató jellege van. Az illeszkedés, fordított illeszkedés és a tisztaság értékét százalékban kalkulálja a szoftver. Az illeszkedés és fordított illeszkedés azt jellemzi, hogy a minta spektruma mennyire illeszkedik a spektrumkönyvtár adott találatához és fordítva. A tisztaság mértéke pedig a minta spektrumában levő extra ionok mennyiségétől függ, amik a lehetséges pozitív találat spektrumára nem jellemzőek.

Tapasztalataim szerint az illeszkedés és a fordított illeszkedés szerinti sorba rendezésnek van jelentősége. Ha egy lehetséges pozitív találat mindkét értéke 70 % feletti, és a mintából nyert spektrum ránézésre is hasonlít a könyvtári spektrumhoz, valamint a tisztasága is elfogadható (>70 %), akkor a találat pozitívnak fogadható el. (A tisztaság nem lesz megfelelő önmagában, ha az illeszkedés és fordított illeszkedés értékek nem megfelelőek.)

Minden esetben a TIC kromatogramon megjelenő csúcs apex részéből érdemes előhívni a három EPI spektrumot, mert a koncentráció itt a legnagyobb. Azonban a túl nagy koncentráció a spektrum torzulását okozhatja, ami a lehetséges pozitív találatok illeszkedés és fordított illeszkedés értékeit csökkenti, így megnehezíti az analitikus döntését. Ennek megoldására, a csúcs váll részéből kell előhívni és beazonosítani a három EPI spektrumot. Egy TIC

kromatogram (egy minta) kiértékelése kellő gyakorlattal 5-10 percet vesz igénybe.

5.3.4.2 Téves pozitív találatok

Téves pozitív találatról akkor beszélünk, ha a peszticidet az „EPI screening” módszer azonosította és ezt az analitikus elfogadta, de az „MRM módszer” nem erősítette meg. Az „EPI módszer” akkor veszi fel az EPI spektrumokat, ha a 300 átmenet valamelyike átlépi az előre beállított intenzitás értéket, de semmi nem garantálja, hogy az átmenet intenzitás-növekedése az egy peszticidből ered. A minta mátrix-alkotói és egyéb szennyező anyagok is okozhatnak téves találatokat. Tulajdonképpen minden találat, amit az analitikus elutasít, téves pozitívnak mondható, ebben az esetben azonban nem szerencsés megnevezés ez, mert már a döntéskor ki lettek zárva.

Gyakori hibalehetőség volt a fenthion azonosítása salátában, mert a saláta extraktum fenthionnal megegyező retenciónál eluálódó mátrixkomponense nagyon hasonló EPI spektrumokat eredményezett, mint maga a fenthion. A hibás azonosítás azonban gyakorlattal kiküszöbölhető. Ha az azonosítás kétséges és a kérdéses peszticidet az MRM módszer tartalmazza, akkor meg kell mérni ezzel is, ha viszont nem, akkor be kell szerezni ebből a komponensből a sztenderdet és ennek segítségével végrehajtani az azonosítást.

A mátrix interferencia gyakrabban terheli a kis tömegű ($m/z < 200$) peszticidek azonosítását és azokat, amiknek csak egy jellemző fragmense van. A téves pozitív vagy negatív találatok esélye ezeknél nagyobb. Ennek példája a diphenylamine, melynek molekulatömege 169.2, és ez csak 170.0/93.0 átmenetet produkálja. Ráadásul az EPI spektrumon csak a m/z 93.0 fragmens látszik, mert még a legkisebb (20 V) ütközési energiával is teljesen eltűnik a kvázi-molekulaion.

A TIC kromatogramok kiértékelése nagy figyelmet igényel az analitikustól. A kiértékelés hosszát megnöveli, és bonyolultabbá teszi, ha analitikailag

bonyolult - mint a nagy zsírtartalmú (pl.: avokádó) vagy nagy aroma és illóanyag tartalmú (pl.: hagyma, fokhagyma és gyömbér) -, mátrixok kromatogramjait elemezzük.

5.3.4.3 Téves negatív találatok

Téves negatív találatról akkor beszélünk, ha az adott peszticidre az „EPI screening” módszer negatív volt, ezzel szemben az MRM módszer azonosította. Téves negatív találatokra csak akkor derülhet fény, ha egy más peszticid azonosítása miatt a mintát újra kell mérni az MRM módszerrel. A téves negatív találatok oka lehet a két módszer közti kimutatási határbeli különbség (lásd a **mellékletek / 7. táblázatot**). A másik ok természetesen a TIC kromatogram figyelmetlen kiértékelése, amely az analitikusra helyezi a felelősséget. A kereskedelemből származó mintákban például boscalid-ot répában (33 µg/kg), narancsban (17 µg/kg) és szőlőben (29 µg/kg), quinoxifen-t szőlőben (10 és 12 µg/kg) és triadimenol-t szőlőben (18 µg/kg) detektáltam az MRM módszerrel úgy, hogy azt előzetesen az EPI módszer nem jelezte. Nem lehet tudni, hogy téves negatív találatok hányszor következtek be az általam mért 200 kereskedelemből származó mintában (lásd később), mikor azokat nem kellett újramérni az MRM módszerrel, de az EPI módszer kimutatási határánál nagyobb koncentrációban nem volt példa téves negatív találatra, ami jól bizonyítja az EPI módszer hatékonyságát.

A téves negatív találatok esélyét növeli az IDA kritérium küszöbértékének (jelen módszerben ez 500 cps) csökkentése, mert ez növeli az algoritmus alapján azonosított komponensek számát. Ebből a szempontból a küszöbérték egy kritikus paraméter. Úgy találtam, hogy az 500 cps optimális arra, hogy az MRM módszer kimutatási szintjének megfelelően az EPI spektrum felvétel is biztosítva legyen. Ennél alacsonyabb beállítás növeli a TIC kromatogramon megjelenő csúcsok számát, emiatt növeli annak kiértékelési idejét. Természetesen a hasonló funkcióval ellátott új generációs műszerek érzékenyebbek (és gyorsabbak is).

Téves negatív találatot eredményezhet továbbá két célkomponens ko-elúciója is, vagy ha egy célkomponens a nála intenzívebb átmenetet adó mátrixkomponenssel eluálódik együtt. Ezzel részletesen az **5.3.4.4 fejezetben** foglalkozok.

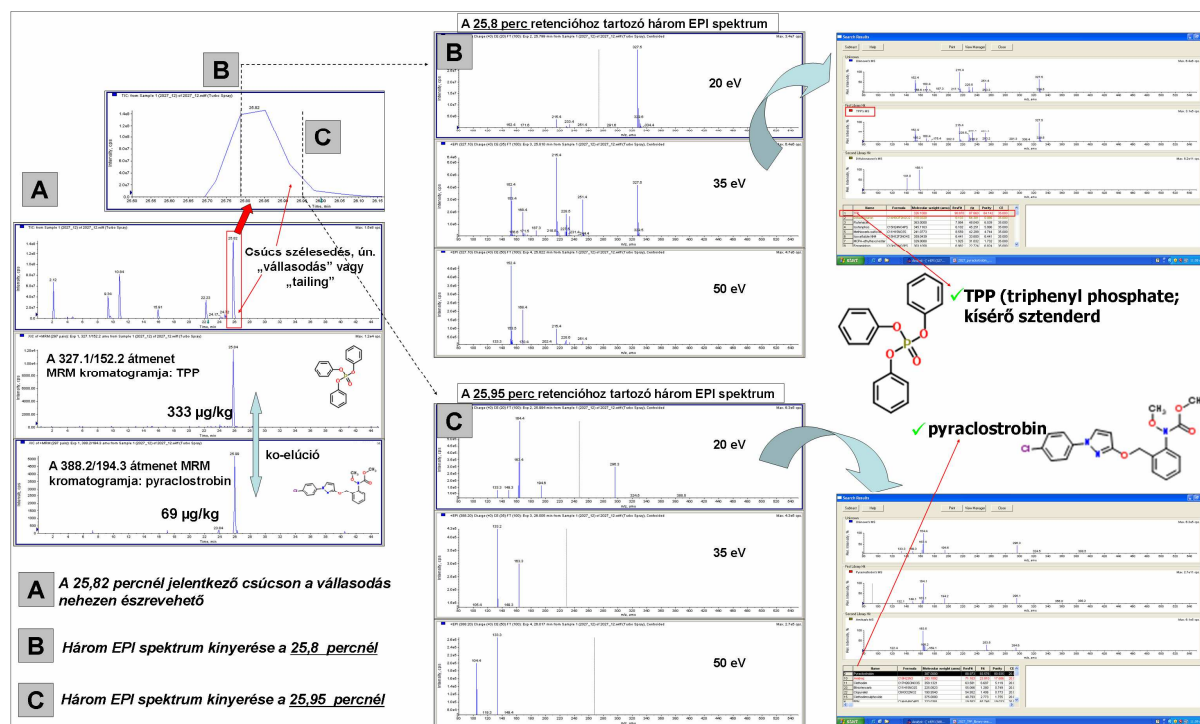
5.3.4.4 Előnyök és hátrányok

Mint ahogy minden módszernek, ennek is vannak előnyei és hátrányai. Nagy előny, hogy egy mérésből kevesebb, mint 1 óra alatt (45 perc mérés + 10 perc kiértékelés) 300 peszticidről lehet információnk ráadásul úgy, hogy sztenderdek használata nem szükséges. A módszert ki lehet terjeszteni új komponensre, de az optimáláshoz és a spektrumok felvételéhez előzetesen be kell szerezni a sztenderdet. Bár az egy időablakba foglalható átmenetek (peszticidek) száma limitált, új időablak(ok) nyitásával ez bővíthető. Egy másik előny, hogy mind a 300 peszticidre nem szükséges kiterjedt validálást végezni, bár azt lényeges ellenőrizni, hogy ha a minta tartalmaz peszticidet, akkor a módszer tényleg detektálja-e. Általában egy mintában nincs, vagy csak néhány peszticid van jelen a 300 célkomponensből, és ha a minta csak kevés mátrix-komponenst tartalmaz, akkor a kiértékelés nagyon egyszerű.

Hátrány, hogy - bár a műszer EMS módban alkalmas nagy tömegpontosságú érzékeny mérésekre -, az EPI módszer nem alkalmas ismeretlen komponensek azonosítására. A TOF technikákkal ez teljes pásztázás módban jóval hatékonyabb. Továbbá ha a mátrix nagyon bonyolult, a sok mátrixkomponens miatt a kiértékelés nehéz és időigényes.

Az előző (5.3.4.3) fejezetben szó volt a ko-elúció miatt lehetséges téves negatív találatokról. A műszer ugyanis egy adott retenciónál csak az adott pillanatban legintenzívebb átmenet kvázi-molekulaionjáról készít EPI spektrumokat (függetlenül attól, hogy a kevésbé intenzív átmenet is átlépi a küszöbértéket). Ez problémát jelenthet, ha két célkomponens együtt eluálódik és mindkettő jelen van a mintában. Ez akkor is fennállhat, ha egy mátrixkomponens egy mért peszticiddal azonos, intenzív átmenetet produkál,

ami elfedi a tényleges célpeszticidet. Két komponens együtt eluálódásának tipikus példáját mutatom be az **17. ábrán**.



17. ábra Lehetséges téves negatív eredmény: a TPP és a pyraclostrobin ko-elúciója alma mintában. A: TIC és a TPP és a pyraclostrobin MRM kromatogramjai; B: EPI spektrum a csúcsnál extrahálva (25,8 percnél) és a TPP azonosítása és C: EPI spektrum a csúcs vállánál extrahálva (25,95 percnél) és a pyraclostrobin azonosítása

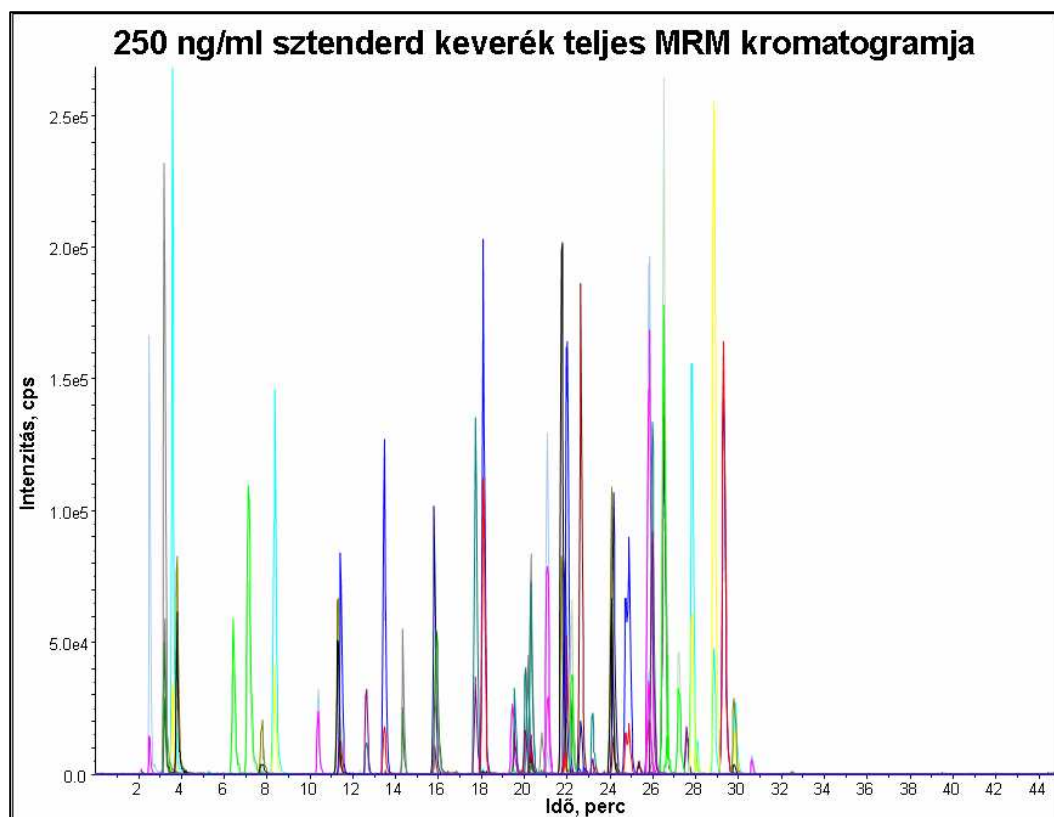
A fenti ábra a TPP (25,8 perc) és a pyraclostrobin (26,0 perc) együttes elúcióját szemlélteti. A pyraclostrobin nehezen észrevehető a TIC kromatogramon, mert azt a TPP csúcsa elfedi (A). Ennek a nagyított képén válassodás figyelhető meg. A csúcs apex részéből nyert EPI spektrumok alapján egyértelműen a TPP-t azonosítható (B). A csúcs nehezen észlelhető váll részéből nyert három EPI spektrum (C) már egyértelműen a pyraclostrobin-t azonosítja be. Természetesen a TPP azonosítása elvárható minden mintában, mert ezt kísérő sztenderdként alkalmaztam 0,333 mg/kg koncentrációban. Mindkét komponens átmenetét extrahálva az MRM kromatogramból, látható, hogy a ko-elúció tényleg valós. Ebben az alma mintában az MRM módszerrel meghatározott pyraclostrobin koncentrációja 0,069 mg/kg volt. Az analitikusnak ezért a kromatogramok értékelésekor

extra figyelmet kell szentelnie a csúcsalakok ellenőrzésére is és nem csak TPP esetén!

5.3.5 Az előzetesen azonosított peszticidek mennyiségi meghatározása

5.3.5.1 Módszerfejlesztés

A célpeszticidek listája 54 peszticidet és a TPP-t (kísérő sztenderd) tartalmazza. A komponensek egyedi sztenderd oldatait (acetonitril:víz 50:50 +0,1 % hangyasav) fecskendőpumpával (úgynevezett „syringe”) juttattam a készülékbe 5 µl/perc-es áramlási sebességgel. (Ez azért tér el az 5.1.2 fejezetben leírt optimálási folyamattól, mert jelen esetben alkalmazott Applied Biosystems 3200 QTRAP készüléken lehetőség van a sztenderd oldat folyamatos bejuttatására (ún. „flow injection”), míg az Agilent 6410 TrippleQuad LC/MS rendszer erre nem ad lehetőséget. Q1 módban ellenőriztem, hogy a molekula hidrogén-adduktja megjelenik-e, majd ennek a tömegét a középső kvadrupolban (q2) fragmentálva a szoftver automatikus optimalizálás funkciójával meghatároztam a két legérzékenyebb fragmenst és azok optimális beállításait. Ezeket, valamint a retenciós időket, csúcsszélességeket, MRM arányokat és a kimutatási határokat mindkét módszerre vonatkozóan a **mellékletek / 7. táblázatában** foglaltam össze. Csak a haloxyfop adott egyetlen fragmenst, ezért az 55 peszticid összesen 111 átmenetet jelent. A kvázi-molekulaion egy komponenst (propargite) kivéve hidrogén-addukt ($[M+H]^+$) volt. A propargite erős ammónium-addukttal ($[M+NH_4]^+$) jelentkezett. Az 55 peszticid (+TPP) (mind 250 ng/ml) MRM kromatogramját az **18. ábrán** mutatom be.



18. ábra 56 peszticid teljes MRM kromatogramja

5.3.5.2 Előnyök és hátrányok

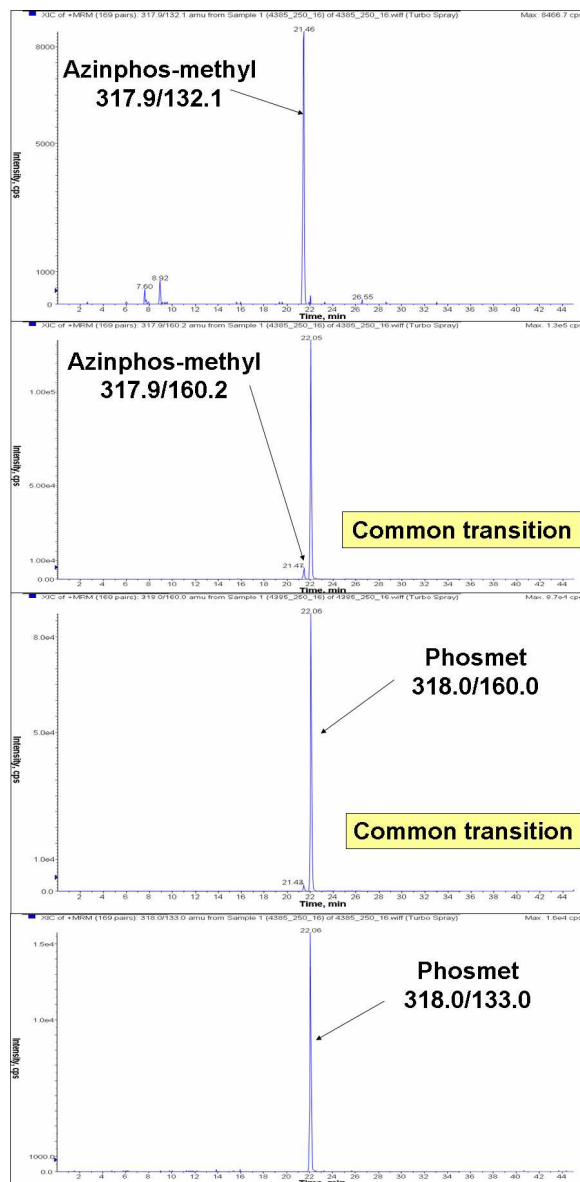
A mennyiségi meghatározásra szánt célpeszticidek listáját úgy határoztam meg, hogy összegyűjtöttem elsődlegesen a magyar, másodlagosan az európai piacról a zöldségekben és gyümölcsökben gyakran mért komponenseket (forrás: Data Pool of the Community Reference Laboratories for Residues of Pesticides). A termékekben való gyakori megjelenésük miatt ezek valóban célpeszticidek. Nem szükséges mind a 300 peszticidre validálni a módszert, az „acetát-pufferelt QuEChERS”-szel elérhető kinyerési hatásfokaikat pedig más szerzők vizsgálták és közölték, melyeket szükség esetén a **pesticides-online** weboldalról adatbázisából [internet 2] lehet ellenőrizni. A kimutatási határokat csak az MRM módban is mért 55 komponensre vizsgáltam (lásd a **mellékletek / 7. táblázatában**), a módszer megfelelően érzékeny, a többi 245 peszticidről azonban nincs információ, de valószínűleg hasonló kimutatási határok érhetőek el ezekre is. A kimutatási határokat úgy határoztam meg, hogy 1; 4; 10; 20 és 40 ng/ml sztenderd keverék oldatokat (tisztá oldószerben oldva) mértem és azt a koncentrációt fogadtam el határnak, ahol a

komponensre jellemző mindkét átmenet csúcsot eredményezett úgy, hogy a jel/zaj arány >3 teljesült. Az MRM módszer kimutatási határai alacsonyabbak, mint az EPI módszeré, ami előny, azonban téves negatív azonosítást eredményezhet. Az EPI screening módszernél a kimutatási határokat úgy határoztam meg, hogy az 55 peszticidet 5 csoportba osztottam úgy, hogy a csoporton belüli peszticidek egymástól elválasztva eluálódjanak. A legkisebb koncentráció, ahol a komponens azonosítható a könyvtárból, lett a kimutatási határ. Mindkét módszer kimutatási határai az aktuális MRL értékeknél kisebbek, tipikusan 0,01 mg/kg alattiak.

A módszer rugalmas, mert az EPI screening módszerrel detektált új komponensekre is bármikor ki lehet terjeszteni. Valamint a sztenderd felhasználás is csökkentett (300 helyett 55), ami környezetkímélőbb, gazdaságosabb és kevesebb labormunkát is igényel, és ez véleményem szerint egyáltalán nem elhanyagolandó.

A mátrix interferenciákat nehéz előre jelezni, azonban két mért peszticid is okozhat interferenciás csúcsokat, ami csak akkor probléma, ha együtt eluálódnak. Ezt a mért átmenetek összevetésével meg lehet határozni. Ennek egy tipikus példája a **19. ábrán** látható azinphos-methyl és a phosmet interferenciája.

A kis tömegpontosság miatt a műszer nem tud különbséget tenni az azinphos-methyl 317.9/160.2 és a phosmet 318.0/160.0 átmenete között, ezért ez közös átmenetet eredményez. Azonban az azonosításuk az eltérő második átmenet és retenciós idő miatt megoldott.



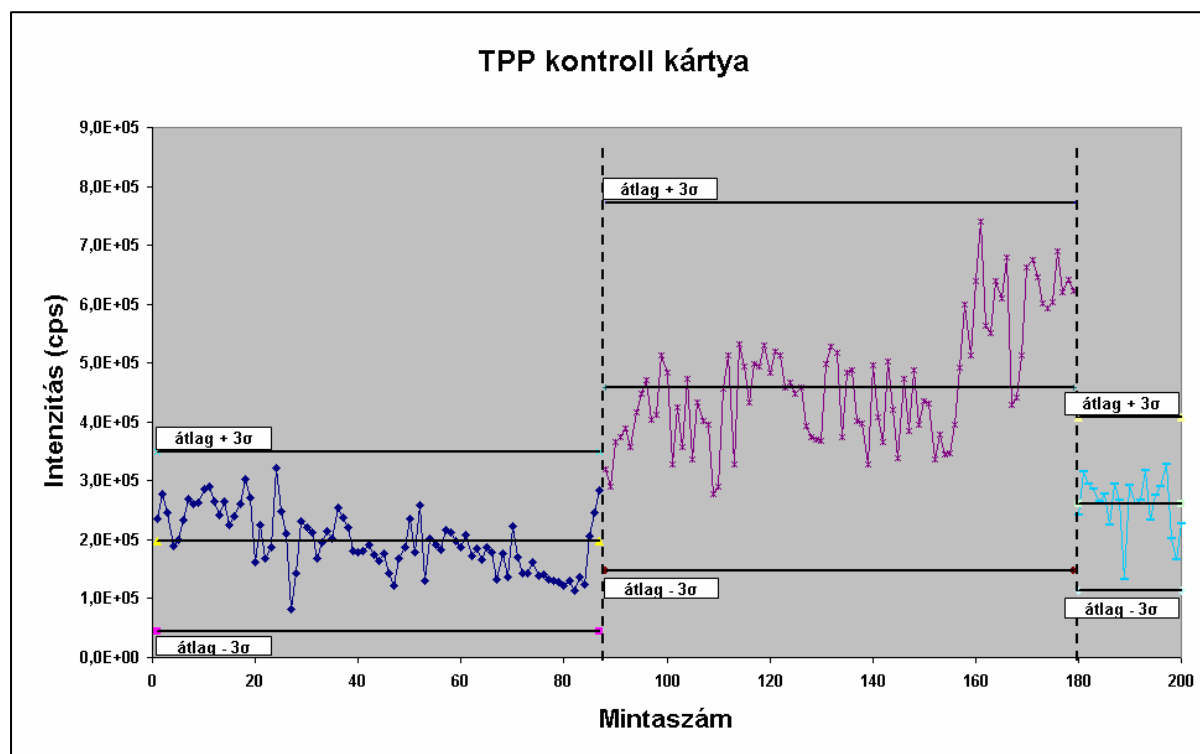
19. ábra Két vizsgált peszticid interferenciája a közös átmenet miatt

5.3.5.3 Mátrixhatás és kalibráció egyenesek adatbázisa

A mennyiségi peszticid mérés „Achilles sarkát” a mátrixhatás jelenti. A mátrixhatás helyes kiküszöbölése csökkenti a mérési eredmény bizonytalanságát, ezért a sokkomponenses peszticid analitikában mátrix-illesztett kalibráció a leggyakoribb, mint ahogy erről már szó is volt. A vak-mátrixok alkalmazása sem garantálja, hogy egy mátrixra illesztett kalibráció jól kompenzálja a másik mátrix hatását. Sőt, azonos mátrixok között is lehetnek különbségek. Ha egy mintasorban többféle mátrixot akarunk mérni, felvetődik a kérdés, hogy melyik mátrixra illesszük a kalibrációt vagy mindegyikre illesszünk-e. Ez utóbbi jelentősen megnöveli a mérések számát,

de pontosabb eredményt ad, mint az első opció, ami ezzel szemben gazdaságosabb. A SANCO rendelet lehetőséget ad mátrix-csoportok egy bizonyos mátrixra illesztett kalibrációjára [**internet 6**], továbbá az európai körmérési gyakorlatban is kivétel nélkül mátrix-illesztett kalibrációt alkalmaznak.

Jelen tanulmányban sztenderd addíciós kalibrációt alkalmaztam, ami kétségtelenül megnöveli a mérések számát a mátrix-illesztett kalibrációhoz képest, de ezzel a célom az volt, hogy tanulmányozzam a mátrixok közötti és azonos mátrixok közötti különbségeket is. Egy egyéves periódus alatt ezért a sztenderd addíciós kalibrációs egyenesek meredekségeiből adatbázist hoztam létre 12 mátrixon, mátrixonként 10 mintán a vizsgált 54 peszticidre, azaz összesen 6480 kalibrációs egyenes egyenletének felhasználásával. Az oxamyl túl érzéketlennek bizonyult, hogy releváns következtetést tudjak az adataiból levonni, ezért a tanulmány e részéből kihagytam. Az adatbázis létrehozásának első próbájaként a kalibrációs egyenesek még mátrixon belül is nagy szórást mutattak. A műszer érzékenysége hónapról hónapra vagy akár napról napra változhat, és nagyban függ a karbantartástól és felhasználói tisztítástól, valamint a detektorra kapcsolt feszültség nagyságától is. A nagy ingadozások miatt az adatbázisból nem lehetett levonni semmilyen következtetést, egyedül azt, hogy az egyenesek meredekségeit valahogyan normalizálni kellene. Ehhez kézenfekvő megoldás a TPP intenzitásával való normalizálás, mert a TPP koncentrációja minden mintában állandó (0,333 mg/kg) és intenzitásának ingadozása jól jellemzi a műszer az egyes mintasorok mérése alatt mutatott érzékenység-ingadozását. Természetesen ez nem jelentős egy mintasor mérése alatt, de egyéves tanulmány alatt befolyással van az adatbázis létrehozására. A SANCO rendelet egyébként előírja, hogy egy mintasornak minimum egy kalibrációs sort is kell tartalmaznia pontosan a lehetséges érzékenység-ingadozások miatt. Az egyéves tanulmány keretében lemért 200 mintában a TPP esetén tapasztalt intenzitás értékek alakulásáról kontroll kártyát készítettem, melyet a **20. ábrán** szemléltetek.



20. ábra Triphenyl phosphate (TPP) jelző sztenderd (0,333 mg/kg) intenzitásaiból készített kontroll kártya

Ez a klasszikus kontroll kártya fogalmát és funkcióját nem meríti ki, mert nem gyártásközi ellenőrzésről van szó, de a TPP ingadozás jól demonstrálja a műszer érzékenység-ingadozását. Persze az ingadozás nem csak a műszerből, hanem az eltérő mátrixok TPP-re gyakorolt hatásából is ered. A 90. mintáig az értékek nagyjából $2 \cdot 10^5$ intenzitást mutattak, ezután azonban jelentős javulás következett. Ennek okai az ionforrás jelentős tisztítása és a detektorra kapcsolt feszültség növelése (2400 V-ról emeltem 2500 V-ra) voltak. Az ionforrás függöny lemez (curtain plate) részét minden héten egyszer tisztítottam, ami eredményezhette a kisebb ingadozást, de a 90. mintánál nem csak a függöny lemezt, de a közvetlenül a 0. kvadrupol (Q0) előtt levő nyílás lemezt (orifice plate) is tisztításra került. A 180. mintánál érzékenység romlás következett be, mely más felhasználók piszkos mintáitól és/vagy a detektor egy öregedési lépésétől eredt. A TPP egy mintában tapasztalt átlagostól jóval eltérő kisebb intenzitásának oka lehet a minta-előkészítés során vétett hiba vagy a mintatartó edény esetlegesen alacsony mintaszintje miatt bekövetkező kisebb térfogatú injektálás, amelyeket ilyen esetekben felül kell vizsgálni az analitikusnak.

A kalibráció egyenesek meredekségein alapuló adatbázishoz ezért minden peszticid esetén minden kalibrációs pont intenzitását elosztottam az aktuális mintából nyert TPP intenzitásával. Az így kapott normalizált kalibrációs egyenesek meredekségeiből felállított adatbázist a **mellékletek / 8. táblázata** tartalmazza. Vastaggal jelöltem azokat az értékeket, melyek >20 % szórást mutattak, ami jellemző a mátrix-pesticid párok több mint felére. A mátrixok közötti jelentős eltérés alátámasztja azt, hogy nem érdemes egy mátrix kalibrációjához hasonlítani egy másikat, sokszor még a saját mátrix kalibrációi is igen nagy eltéréseket mutattak. A táblázat utolsó oszlopának adatai jól jellemzik az egyes peszticidek közti általános érzékenység különbségeket. Ez alapján a kresoxim-methyl, isofenphos és propargite voltak a legérzékenyebbek, valamint az oxamyl, ami ezért nem került bele a táblázatba, ezzel szemben például a buprofezin, diazinon és pyriproxyfen igen érzékenyek. Az utolsó oszlopban vastaggal jelölt értékekhez tartozó peszticidek érzékenysége pedig jelentősen függ a mátrixtól.

Az adatbázis jelentősége továbbá az, hogy ezt felhasználva prognosztizálni lehet, hogy az „EPI screening” módszer által előzetesen a mintában detektált (általában egy vagy néhány) peszticid mennyiségi meghatározásához alkalmazhatunk-e eltérő mátrixra illesztett kalibrációt vagy sem. Ha például egy mintasorban 5 paradicsom és két körte mintát akarunk mérni, és a körtemintában előzetesen csak thiamethoxam-ot és difenoconazole-t detektáltunk, akkor ezt lehet a paradicsomra illesztett kalibrációval végezni, mert erre vonatkozó empirikus mérőszámaik közt csak kis különbség van, viszont ha a körtében phosmet is van, melynek mérőszáma jelentősen eltér a paradicsomban és körtében, akkor érdemes körtére illesztett kalibrációt alkalmazni. Reményeim szerint ez egy felhasználók számára hasznos adatbázis, mellyel lehetőség szerint a mérések száma és így az analitika költsége is csökkenthető információvesztés nélkül.

5.3.6 Egyéves rutin alkalmazás: magyar minták mérése

A módszer-kombinációt 2008. márciusától 2009. februárjáig tartó időszakban a kereskedelemről származó 200 minta mérésén alkalmaztam. 13 fajta gyümölcs, 12 fajta zöldség, valamint gombaminták kerültek analízisre. Hat

darab zöldség-mix mintát is mértem, ez egyik csoportba sem illett bele, ezért ezt a **2. táblázat** alján az „egyéb” kategóriába soroltam.

2. táblázat A pozitív minták alakulása mátrixonként 200 rutin minta (2008 március – 2009 február) alapján.

	Minta	Pozitív minta / összes minta
Gyümölcsök	Alma	7/14
	Szőlő	6/9
	Citrom	8/8
	Görögdinnye	2/8
	Körte	5/6
	Barack	3/6
	Banán	5/5
	Nektarin	3/3
	Ananász	0/2
	Eper	2/2
	Grapefruit	2/2
	Narancs	2/2
	Sárgadinnye	0/2
Zöldségek	Paprika	10/23
	Saláta	10/18
	Paradicsom	5/15
	Káposzta	7/16
	Sárgarépa	5/6
	Fokhagyma	2/5
	Uborka	4/5
	Paszternák	1/5
	Hagyma	0/5
	Zeller	2/3
	Retek	0/2
	Tök	0/2
Más	Gomba	3/8
	Egyéb	6/9
Összes		100/200

A zöldségminták tipikusan Magyarországról és szomszédos EU országokból, azonban sok gyümölcs - természetesen az összes trópusi gyümölcs -, déli EU tagállamokból (Spanyolország, Olaszország, Görögország) vagy nem-EU területről (Közép- és Dél-Amerika, Törökország) származtak. Származás szerinti eloszlásukat a **3. táblázat** tartalmazza.

3. táblázat Pozitív minták alakulása a származás alapján.

Származás	A vizsgált minták száma	Ebből a pozitív minták száma; (%)
Magyarország	137	60; (44%)
Más EU tagállam	40	23; (58%)
Nem EU tagállam	23	17; (74%)
Összesen	200	100; (50%)

A vizsgált minták pontosan fele tartalmazott legalább egy peszticidet a pásztázott 300-ból (5-nél több peszticid csak egy mintában fordult elő), a másik fele pedig negatív volt a 300 peszticidre.

Hogy a pozitív minták milyen peszticideket milyen koncentráció-tartományban tartalmaztak, a **mellékletek / 9. táblázatában** összegeztem.

A leggyakrabban detektált peszticid gyümölcsökben az imazalil és thiabendazole, zöldségekben az azoxystrobin volt. Ezek közül az azoxystrobin koncentrációja relatíve alacsony (0,010-0,551 mg/kg) volt, ennél nagyobb koncentrációban találtam thiabendazole-t (0,899 mg/kg) és imazalil-t (6,655 mg/kg), de ezek ennek ellenére sem lépték túl a rájuk szabott aktuális határértékeket. Prochloraz-t magas koncentrációban mértem három citrom mintában is, melyek Argentinából és Törökországból származtak, valamint boscalid egy káposzta mintában (10,4 mg/kg) lépte túl az amúgy is magas határértéket.

A diphenylamine is gyakori szennyező volt, de az előzőektől külön kezelendő, mert csak a nyári időszakban és mátrixtól függetlenül fordult elő alacsony (0,007-0,081 mg/kg) koncentrációban. Ez arra enged következtetni, hogy a tároló helységben kezelhették a termékeket vagy valamilyen nem szándékos általános szennyezés következett be tárolás során. A diphenylamine mellett hogy gombaölő szer, antioxidáns tulajdonságú és az ipari humán és állatgyógyászgyártás során is alkalmazzák segédszerként. A növényvédelemben elsősorban antioxidáns tulajdonsága miatt almatárolás során alkalmazzák, de az antioxidáns hatás általános, így könnyen elképzelhető, hogy minden más terméket is kezeltek vele a raktárhelyiségben. Ez természetesen csak az adatokból következő feltételezés, bizonyítást nem nyert.

Mindent összevetve a vizsgált minták 50 %-a volt szennyezett a 300 peszticid valamelyikével és csak 6 % esetén (12 minta) volt a carbendazim, dimethomorph, diphenylamine, nicobifen, haloxyfop, diazinon és dimethoate valamelyikére határérték túllépés az egyéves periódus alatt.

5.3.7 Következtetések

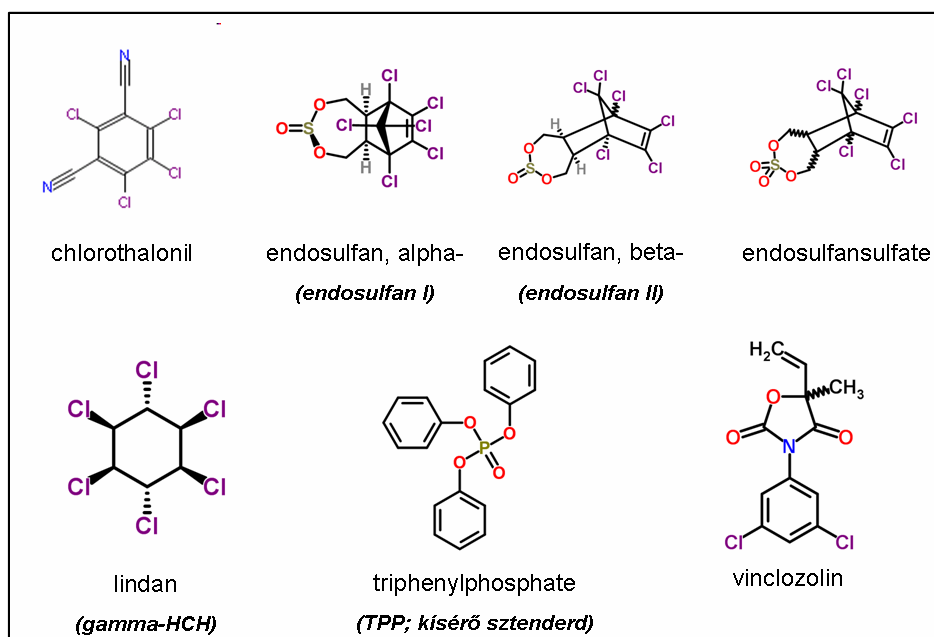
A kidolgozott módszerkombinálási eljárás hatékony és tökéletesen alkalmazható rutin mérésekre. A gyors és egyszerű EPI screening módszerrel 45 perc mérési és 10 perc kiértékelési idő alatt a mintában 300 peszticid esetleges előfordulásáról lehet információt kapni. A mintamátrixok miatti interferenciák és a két módszer kimutatási határai közötti különbségek téves pozitív vagy negatív találatokat eredményezhetnek, de ezek tapasztalataim szerint nem jelentősek, a téves negatív találatok pedig tipikusan alacsony koncentráció tartományban fordulnak elő. A mennyiségi MRM módszer tetszőlegesen bővíthető új, eddig nem detektált peszticid(ek)re. Az, hogy csak az előzetesen detektált peszticideket kell mennyiségileg mérni és ezáltal a sztenderd felhasználás kevesebb, környezetkímélőbb, mint más sokkomponenses módszerek, és a mérés előkészítése (sztenderd keverék oldatok készítése) sem tart hosszú ideig.

Jelen tanulmány által demonstrált 300 komponens együttes meghatározása a maximum, vagy legalábbis közel van a maximumhoz, amit ezzel a műszerrel el lehet érni. Hasonló funkcióval rendelkező új generációs készülékekre a metodika adoptálható és esetlegesen több komponensre kiterjeszthető a gyorsabb pásztázás és nagyobb érzékenység miatt. Sok komponens együttes mérésénél azonban a minta-előkészítésnek elég egyszerűnek kell lennie ahhoz, hogy minden mérni kívánt komponenst megfelelő kinyeréssel az analitikus számára mérhető oldatba hozza. Az alkalmazott „acetát-pufferelt QuEChERS” ezeknek a feltételeknek megfelel és jól működött a zöldségek és gyümölcsök széles spektrumán.

5.4 Módszerfejlesztés néhány klórtartalmú peszticid meghatározására fűszerekből és teából GC-MS/MS és GC×GC TOFMS technikákkal. Egy összehasonlító tanulmány

5.4.1 Peszticidek és mátrixok kiválasztása

Bár a kísérleteim negyedik egysége nem meríti ki a sokkomponenses módszer fogalmát, melynek az oka az, hogy peszticidek meghatározása a jelentős háttérrel eredményező extraktumokból (mátrixokból) még gyermekcipőben jár. A cél itt ezért nem az volt, hogy egy módszerbe minél több peszticidet lehessen együtt meghatározni, hanem csak pár komponenst, de meglehetősen nagy háttérrel adó extraktumokban akartam vizsgálni. Ezért néhány klórtartalmú, GC-vel mérhető peszticidet választottam: chlorothalonil, endosulfan alpha, endosulfan beta, endosulfan sulfate, lindane, vinclozolin és a TPP, melyet kísérő sztenderdként alkalmaztam. Molekulaszerkezeti felépítésüket a **21. ábra** mutatja.



21. ábra A kiválasztott klórtartalmú peszticidek szerkezete

A módszerfejlesztés előtt tisztáztam, hogy egyáltalán milyen mátrixokat válasszak. A száraz mátrixok, melyekből valószínűleg nagy mennyiségű színanyag, aroma, növényi olaj oldódik a szerves fázisba, megfelelőnek tűntek, ezért piros fűszerpaprikát, őrölt borsot és fekete teát választottam.

5.4.2 Minta-előkészítés

A minta teljes tisztítása nem volt cél, egy egyszerű minta-előkészítési módszert választottam, mely a következő lépésekből áll:

- (i) 1,0 g előzetesen homogenizált száraz (por vagy őrölt) minta bemérése egy 15 mL-es PTFE anyagú centrifuga csőbe.
- (ii) 10 ml acetonnitril adagolása, majd rázatás kézzel 30 másodpercig.
- (iii) A minta vízfürdőbe helyezése és ultrahangos rázatása 30 percig.
- (iv) A minta centrifugálása (3700 rcf) 5 percig.
- (v) 1 ml felülúszó bemérése 2 ml-es mintatartó üvegedénybe, elpárologtatása, majd visszaoldása 1 ml etil acetátba.
- (vi) Szűrés 0,45 µm PTFE anyagú szűrőn, majd injektálás.

A minta-előkészítés így a minta tízszeres hígítását jelenti.

A kinyerési hatásfok vizsgálatára a laboratóriumon belüli referencia anyagot szokás készíteni. Ezt nagy víztartalmú mintáknál a mintához adagolt - a mintánál jóval kisebb térfogatú - tömény sztenderd keverék oldat hozzáadásával lehet elérni. Ez gyakorlatban azt jelenti, hogy 100 g nagy víztartalmú gyümölcs-püré 1 ml 10 µg/ml sztenderd oldat adagolásával a minta 100 ng/g koncentrációra dúsítható. Ezzel szemben a száraz mátrixok esetén hasonló módszer alkalmazásának az a veszélye, hogy a minta nem homogenizálható megfelelően. Ezért a dúsítási lépést alacsonyabb koncentrációjú, de nagyobb térfogatú sztenderd oldattal végeztem. A mérendő extraktumban 100 ng/ml koncentrációt kívántam elérni és a tízszeres hígítási lépés miatt a száraz mintát így 1000 ng/g koncentrációra kellett dúsítani. Ehhez 25 g száraz mintához 50 ml 50 ng/ml sztenderd keveréket (acetonnitrilben) mértem, az így keletkezett szuszpenziót rozsdamentes acélkanállal gondosan elkevertem, majd nitrogénáram alatt megszáritottam és újra homogenizáltam. Ezt „hagyományos dúsítás”-nak neveztem. Nem voltam benne biztos, hogy a hígítás és bekonzentrálás elegendő homogenitást biztosít veszteség nélkül, ezért egy másik dúsítási technikát is alkalmaztam. Ennek a lényege, hogy 1,0 g bemért mintához 100 µl 10 µg/ml (vagy 200 µl 5 µg/ml)

szttenderd keveréket mértem, majd állni hagytam 20 percig és elvégeztem az extrakciót. Ezt a technikát „közvetlen dúsítás”-nak neveztem.

5.4.3 GC-MS/MS módszer kidolgozása, a mérési paraméterek

A meghatározáshoz a 4.2.2 fejezetben bemutatott műszert és oszlopot alkalmaztam. Az elválasztáshoz a következő hőmérséklet gradienst alkalmaztam: (1) 70 °C kezdeti hőmérséklet tartása 3,5 percig; (2) a hőmérséklet emelése 180 °C-ra 25 °C/perc sebességgel; (3) 180 °C tartása 10 percig; (4) a hőmérséklet emelése 300 °C-ra 4 °C/perc sebességgel; (5) ennek stabilan tartása 10 percig. A teljes futtatási idő így közel egy óráig (57,9 perc) tart. A rendszerbe juttatott mintamennyiség 10 µL volt, melyet a szabályozott hőmérsékletű elpárologtató mintabeviteli egységbe (PTV=Programmed Temperature Vaporization) injektáltam. Ennek hőmérséklete: (1) 70 °C tartása 0,5 percig; (2) a hőmérséklet egyenletes emelése 300 °C-ig 100 °C/perc sebességgel; (3) ennek tartása 10 percig. Az injektor programja így 12,8 perc hosszú. A vivőgáz hélium volt, áramlási sebessége 1 ml/perc.

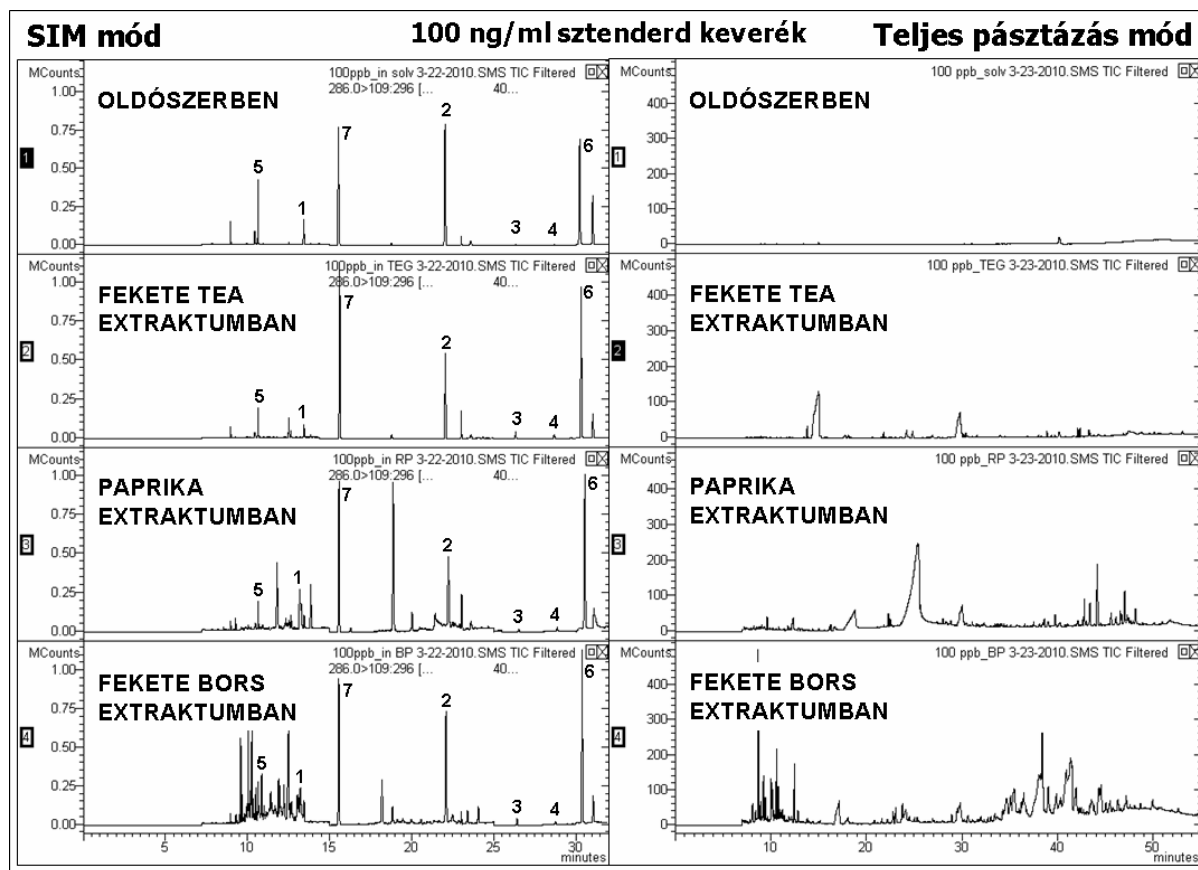
A kiválasztott peszticidek detektálási paramétereinek optimálásához egyedi szttenderd oldatokat alkalmaztam etil-acetátban oldva. Gyors gradiens programot alkalmaztam, és egy oldatból kétszer injektáltam (EI és CI módban) teljes pásztázást alkalmazva, hogy megállapítsam vajon az adott komponens melyik ionizációval mérhető érzékenyebben. Az EI gyakoribb, mint a CI ionizációs forma, jelen módszerben is az endosulfan beta és a vinclozolin ionizálására CI-t alkalmaztam. Az optimált paramétereket a **4. táblázat** tartalmazza.

4. táblázat GC-MS/MS detektálási paraméterek

Peszticid	molekula tömeg	ionizáció	anya ion	gerjesztési feszültség (eV)	termék ion			retenciós idő (perc)
					1	2	3	
Chlorothalonil	265.9	EI	266	*2.0	205	213	-	14.1
Endosulfan alpha	406.9	EI	241	94	206	170	-	23.4
Endosulfan beta-	406.9	EI	241	96	170	206	172	26.7
Endosulfan beta-		CI	407	64	325	327	323	26.7
Endosulfan sulfate	422.9	EI	387	89	253	289	-	29.0
Lindan (γ -HCH)	290.8	EI	219	63	183	181	-	12.9
TPP	326.3	EI	326	118	228	168	215	30.6
Vinclozolin	286.1	CI	286	52	242	244	-	15.9

*:rezonancia mód

Az első lépésben a megfelelő ionizációs móddal az anyaiont határoztam meg, mely kémiai ionizációnál a molekulatömegnél egységgel nagyobb tömeg (ez gyakorlatilag hidrogén addukt), elektronütköztetéssel pedig - mivel itt csak gerjesztésről van szó -, a molekulatömeggel megegyező tömegű ion vagy (gyakrabban) egy intenzív fragmens. Az így regisztrált anyaionból ezután fragmenseket határoztam meg. Ennek megállapítására a gerjesztési feszültséget 10-120 V között 10 egységenként lépcsőzetesen változtattam, majd azt a két egymás melletti feszültségértéket választottam ki, ahol az anyaion intenzitása a legintenzívebb fragmenshez képest 30-50 %-ra csökken. Ezután ugyanilyen lépcsőzetes technikát alkalmazta, de immáron 1 V lépcsőkkel. A fenti táblázatba csak azokat a termékionokat foglaltam, melyek a fő ion (termékionok 1. oszlopa) intenzitásának legalább 30 %-ával jelentkezett. A chlorothalonil volt az egyetlen, amely még a legnagyobb feszültség (120 V) közlésével sem fragmentálódott, köszönhetően stabil szerkezetének. Ilyen esetekben rezonancia módot kell alkalmazni, mellyel az ioncsapdába zárt anyaionnal plusz energiát lehet közölni. A rezonancia és normál mód feszültség-értékei egymással nem hasonlíthatók össze. Az így nyert MS/MS kromatogramokat az **22. ábrán** szemléltetem. Ugyanazon minták teljes pásztázás (full scan) módban felvett kromatogramjai is bemutatom, mert ez jól jellemzi az MS/MS mód nagy szelektivitását.

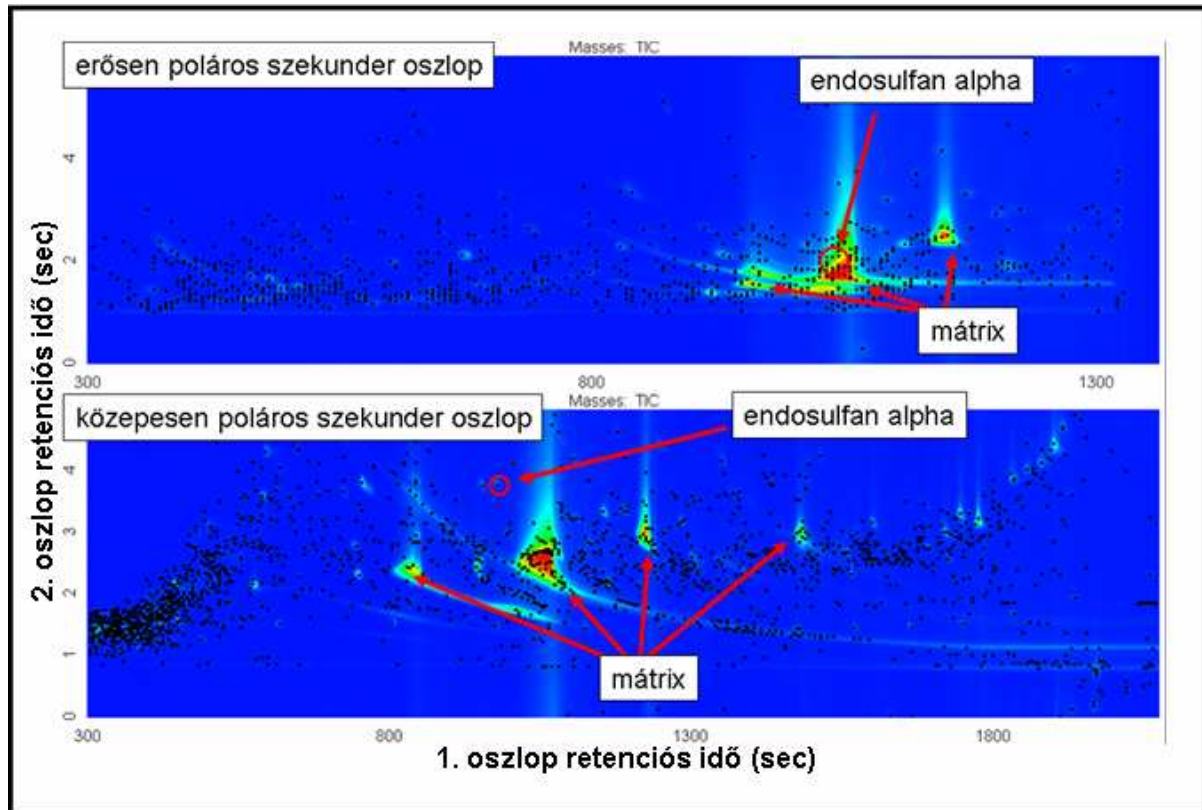


22. ábra GC-MS/MS SIM és „full scan” kromatogramok tiszta oldószerben és extraktumokban 1. chlorothalonil; 2. endosulfan alpha; 3. endosulfan beta; 4. endosulfan sulfate; 5. lindan (γ -HCH); 6. triphenyl phosphate (TPP); 7. vinclozolin

5.4.4 GC \times GC TOFMS módszer kidolgozása, a mérési paraméterek

A kétdimenziós gázkromatográfia elvét már közel 20 éve publikálták [LIU, 1991]. A kétdimenziós elválasztás lényege, hogy egy hosszú (10-30 m) apoláros oszlopot kapcsolnak össze egy rövid (0,5-2 m) poláros oszloppal úgy, hogy közöttük egy fűtésen-hűtésen alapuló eszközzel (úgynevezett modulátorral) pár másodperces ciklusokban modulálják az első oszlopról eluálódó komponenseket. Ezzel a lépéssel az első (egydimenziós) kromatogramot néhány másodperces „szeletekre” lehet vágni és a moduláció kvázi-injektálást jelent a második oszlopra, melyen nagyon gyors elválasztás történik, a modulációval megegyező hosszúságú, pár másodperces kromatogramok nyerhetők. Ebből a szoftver két és háromdimenziós képet tud alkotni.

Az elválasztás hatékonysága függ az oszlopok anyagától, hosszától, hőmérséklettől, gázáramtól és a moduláció frekvenciájától is. Ebben a kísérletben egy apoláros primer oszlop, valamint egy közepesen poláros és egy erősen poláros szekunder oszlop állt rendelkezésemre (lásd **4.2.3 fejezetben**). Az elválasztás hajtóereje a gázáram és a hőmérséklet-gradiens mellett a két oszlop közti hőmérsékletkülönbség, mely általában 10-30 °C (gyakorlatilag egy eltolt hőmérséklet-gradiens), illetve a modulációs hőmérsékletnek a primer oszlop mindenkori hőmérsékleténél 10-30 °C-kal kell magasabbnak lennie. A hőmérséklet gradienst az oszlopok maximális hőmérsékletéhez kell igazítani. Ez az erősen és közepesen poláros szekunder oszlop esetében 270, illetve 320 °C, míg a primer oszlop maximálisan 325 °C-ra fűthető. A kérdés nem az volt, hogy a vizsgált komponenseket el lehet-e választani egymástól, hanem az, hogy azok elválnak-e a mátrixkomponensektől, melyek jelentős zavarást okoznak egy dimenzióban. Ezért 2 µl mennyiségű 500 ng/ml koncentrációra dúsított paprika-extraktummal végeztem az optimálást. A TOFMS detektor teljes pásztázás üzemmódja miatt a komponenseket nem kellett optimálni, mert azokat a szoftver automatikusan azonosítani tudja meglévő spektrumkönyvtárakból. Ezért a módszerfejlesztés az elválasztási technika optimálására korlátozódik. A primer és szekunder oszlop közötti mindenkori hőmérséklet különbséget 15 °C-ra állítottam, a modulációs hőmérsékletet pedig a primer oszlopénál 30 °C-kal magasabbra. A kísérletileg felvett hőmérséklet gradiens létrehozásakor még nem törekedtem a tökéletes elválasztásra, csak azt akartam megtudni melyik szekunder oszlop alkalmasabb, melyikkel folytassam tovább a módszerfejlesztést. A modulációs ciklust is optimálás nélkül 5 másodpercre állítottam. Az **23. ábrán** a két oszlop-kombináció összehasonlítását mutatom be egy mért komponensre vonatkoztatva.



23. ábra Kétdimenziós GC (GC×GC) elválasztás eltérő polaritású szekunder oszlopokkal

Az endosulfan alpha nem választható el az erősen poláros oszlop használatával, ezzel szemben a közepesen polárossal igen. Az összes többi vizsgált peszticidre is ezt tapasztaltam. Továbbá, az erősen poláros szekunder oszlopra injektált paprika mintától a rendszer elszennyeződött (az injektálás után nagy háttér maradt). Ennek oka a polaritásbeli különbség és a maximálisan alkalmazható hőmérséklet. Az erősen poláros oszlop esetén nincs mód 270 °C-nál magasabb hőmérséklet alkalmazására, így a nagyon apoláros komponensek az oszlopokon maradtak, ezzel okozva szennyezést. Az elválasztás és a tisztíthatóság szempontjából is a közepesen poláros oszlopot választottam a további vizsgálatokra.

A modulációs ciklusidőt 2-8 másodpercre érdemes állítani. Ennek optimalizálásánál figyelembe kell venni a komponensek egydimenziós csúcshélességét, valamint, hogy az így ciklusonként kvázi-injektált mintarészletek minden komponense lehetőleg eluálódjon a szekunder oszlopról a következő ciklus kezdetéig. Amennyiben ez nem valósul meg, akkor a

komponens a következő ciklus frontvonala előtt eluálódik, úgynevezett „wrap around” jelenséget hozva létre. Ez azt jelenti, hogy egy ciklus indulásakor az előző ciklusból származó egyes komponensek még az oszlopon vannak. Ez nem előnyös, de a mérést nem zavarja. A megfelelő második dimenziós csúcsalak eléréséhez az első dimenziós csúcst minimum 3-4 szeletre kell vágni. Például ha egy komponens első dimenziós csúcsszélessége 12-18 másodperc, a moduláció maximálisan 4-6 másodperc lehet. Természetesen a 2 vagy 3 másodperces moduláció több szeletet eredményez, de növeli a „wrap around” valószínűségét. A cél tehát, hogy a lehető legtöbb szeletre vágjuk az első dimenziós csúcsokat úgy, hogy közben a „wrap around” jelenséget minimálisan tartsuk.

Kevés optimálást követően az első oszlophőmérséklet-programja a következő: állandó 70 °C 2 percig; majd emelés 25 °C/perc sebességgel 180 °C-ra; ennek tartása 5 percig; majd emelés 6 °C/perc sebességgel 290 °C-ra; és ennek tartása további 5 percig. Így a teljes futtatási idő ~35 percig tart. Ahogy említettem, a szekunder oszlop programja ugyanez, csak 15 °C-kal magasabb hőmérsékleten. Az így elérhető csúcsszélességek 18-24 másodpercesek voltak, ami 5 másodperces modulációt engedélyezett. 4 másodpercet alkalmazva sok esetben volt „wrap around” jelenség, míg 6 másodperc már soknak bizonyult a szeletek szempontjából. Az elektromosan pillanatszerűen felfűthető és folyékony nitrogénnel pillanatszerűen lehűthető modulátor egység egy ciklus alatt 2-szer fűt és hűt, ezt „dual-jet”, azaz kétciklusú modulátornak nevezik. A fűtési és hűtési szakaszok aránya is fontos, általában 40/60, ha a minta nagyon illékony komponenseket is tartalmaz (például a klórtartalmú peszticidek), akkor a fűtési arány kisebb lehet. Ezért 0,8 és 1,7 másodperces fűtési és hűtési szakaszt állítottam be. Az így nyerhető második dimenziós csúcsok szélessége 0,2 másodperc. A pásztázási sebességet 100 spektrum/másodperc-re állítottam, ami a maximum, és ezzel 20 pont jellemez egy második dimenziós csúcst.

A fejlesztett kétdimenziós elválasztást alkalmazva paprika és tea mintában a vizsgált komponensek mindegyike elvált a mátrixalkotóktól, míg fekete bors

mintában a nagy alapzajtól a chlorothalonil-t és az endosulfan sulfate-ot nem tudtam azonosítani.

A peszticidek mellett a mintatartó edény kupakjának szeptumából származó szilikon polimereket, valamint a mátrixból származó meghatározó, nagy háttérrel rendelkező komponenseket is azonosítottam. Ezek a paprikában E-vitamin, kapszaicin és γ -tokoferol, a teában a koffein és a fekete borsban a piperine voltak.

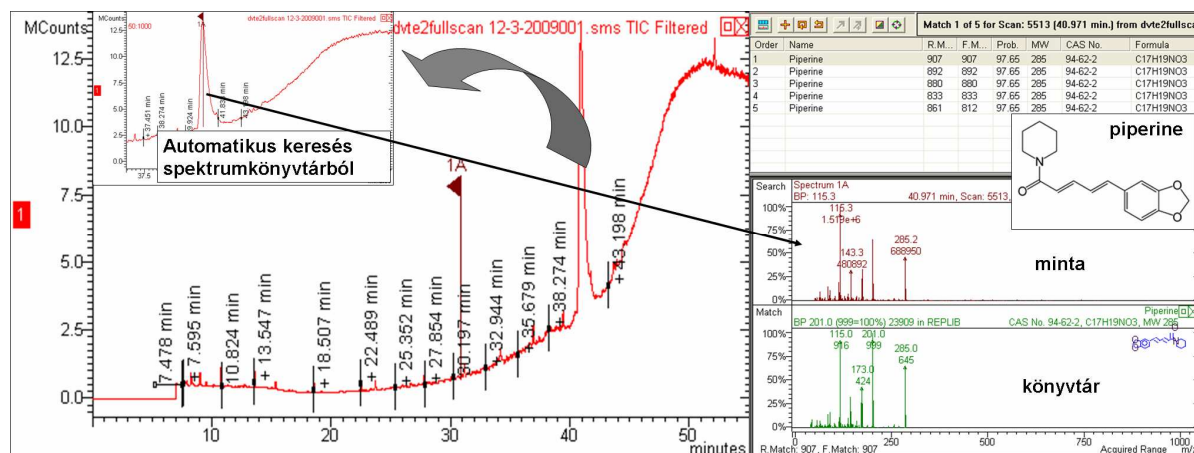
5.4.5 Mátrixhatás

Ebben a fejezetben nem elsősorban a mátrix analitikai jelre, hanem magára az analízisre gyakorolt hatásával foglalkozom.

5.4.5.1 Fűszerek mátrixhatása

A paprika és a fekete bors minták egydimenziós kromatogramjait az **5.4.3 fejezetben** található **22. ábrán** mutatom be. Az egységesített intenzitás tengely és az azonos koncentráció jól reprezentálja a mátrixok és az oldószer közti különbségeket, valamint azt, hogy az MS/MS detektálás szelektívebb. A paprika és fekete bors mintában azonban ennek ellenére is vannak zavaró csúcsok. A teljes pásztázási kromatogramokon jól látszik a mátrix fedése, ami természetesen az ionizációt befolyásolhatja MS/MS detektálás esetén is. A paprika extraktum nagy mátrix csúcsa a kromatogram közepén (~25 percnél) jelentkezett, ami injektálásról injektálásra nem okozott maradandó szennyezést az oszlopon. Ellenben a fekete bors mátrix alkotói főleg a kromatogram végén jelentkeztek, ami azt feltételezi, hogy ezek erősen apoláros vegyületek, így fennáll a veszélye a maradandó szennyezésnek. Azt tapasztaltam, hogy 5 fekete bors minta injektálása után az alapvonal jelentősen megnő, még akkor is, ha csak oldószert juttatok a rendszerbe. Ezért az oszlop teljes tisztítására oldószert kellett injektálnom 5-6 alkalommal 290 °C állandó oszlop termosztálás mellett. A tisztítás folyamán a felvett teljes pásztázási kromatogramon egy nagy karakterisztikus csúcs jelent meg, ami a

szennyezés fő forrása vagy alkotója. Ennek azonosítását a **24. ábrán** szemléltetem.



24. ábra Fekete bors extraktumból származó piperine azonosítása

Spektrumkönyvtárból a piperine-t azonosítottam, ami alkaloid és kifejezetten a fekete bors alkotója, rovarirtó tulajdonságú szer, a fekete bors természetes védelmét biztosítja.

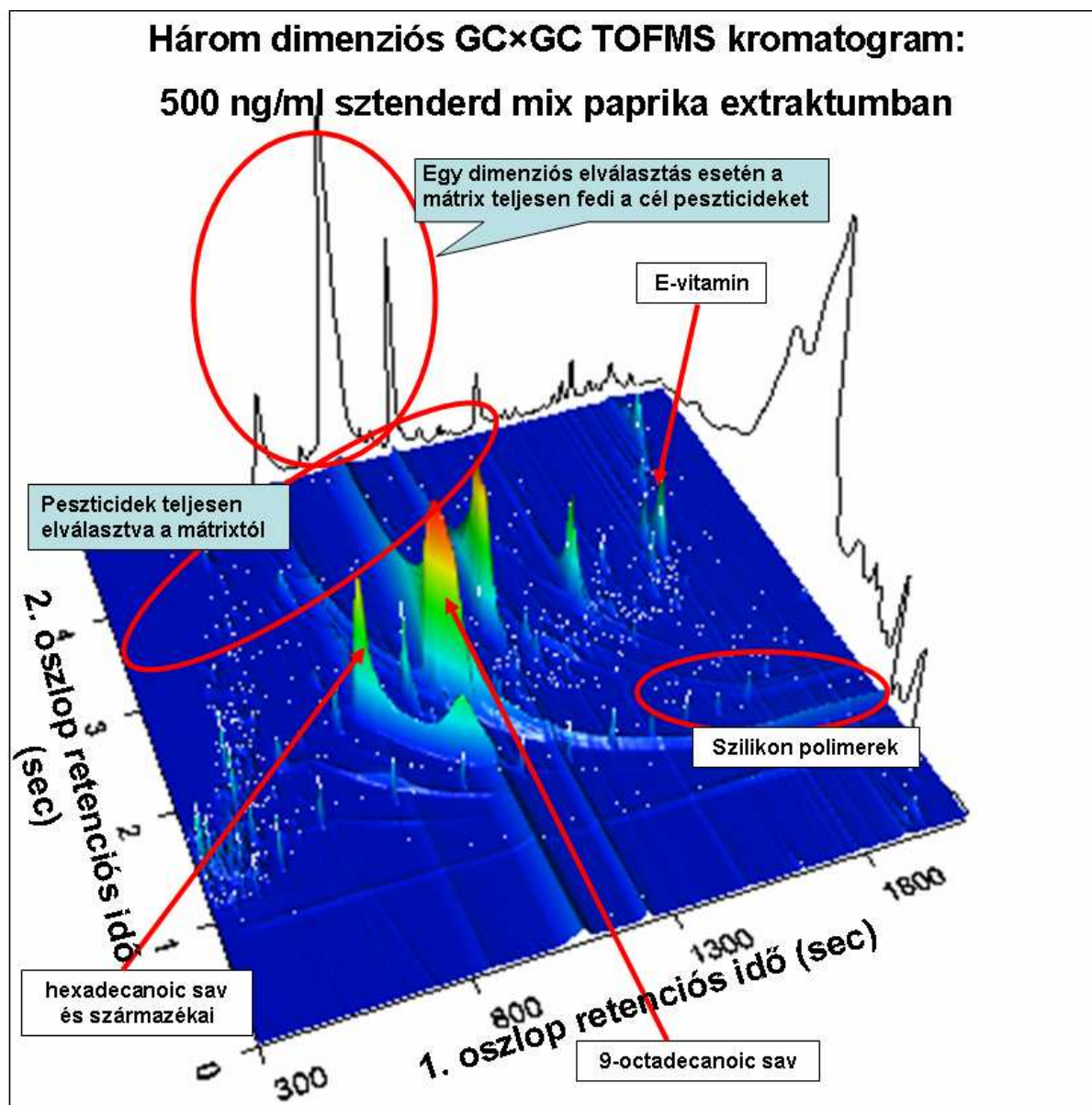
A mátrix jelre gyakorolt hatása GC méréseknél gyakran jelerősítő. Ennek oka, hogy a mátrix alkotói meg tudnak kötődni a liner aktív helyein elfoglalva ezzel a helyet a mérendő komponenstől, ami persze tiszta sztenderd injektálásakor nem áll fenn, csak a mérendő komponens kötődik az aktív helyekhez. Következésképpen több peszticid tud a rendszerbe jutni, ha azonos koncentrációt és mennyiséget mátrixban injektálunk. A mért értékeket az **5. táblázatban** foglaltam össze.

5. táblázat Mátrixhatás paprika és fekete tea mintában GC-MS/MS és GC×GC TOFMS detektálás esetén

Peszticid	mátrixhatás GC-MS/MS és GC×GC TOFMS detektálás esetén			
	paprika GC-MS/MS	paprika GC×GC TOFMS	fe fekete tea GC-MS/MS	fe fekete tea GC×GC TOFMS
Chlorothalonil	<u>197</u>	-	<u>630</u>	-
Endosulfan alpha-	<u>119</u>	59	-9	35
Endosulfan beta-	-	89	-9	49
Endosulfan sulfate	-26	87	<u>111</u>	<u>191</u>
Lindan (γ-HCH)	<u>152</u>	42	8	-19
TPP	5	<u>123</u>	60	84
Vinclozolin	<u>180</u>	63	-3	-27

A sok ko-eluálódó komponens eliminálására jelentősebb mintatisztítás vagy hatékonyabb elválasztás szükséges. A minta-előkészítés már így is egy tízszeres hígítást tartalmaz és további tisztítás kétségtelenül tisztább extraktumot eredményez, de megvan az esélye a komponensek elvesztésének is. Ezért a céloom egy hatékonyabb elválasztás-technika alkalmazása volt. A célkomponensek mátrixtól való teljes elválasztásán túl, a TOFMS detektálás nagy előnye, hogy a teljes pásztázás mód és a spektrumkönyvtárból való azonosítás miatt minden más szennyezőt és a nem célpeszticideket is azonosítani lehet. A teljes elválasztás és azonosítás egy tipikus példája az endosulfan sulfate paprika extraktumban, melyet a **mellékletek / 4. ábrán** mutatok be.

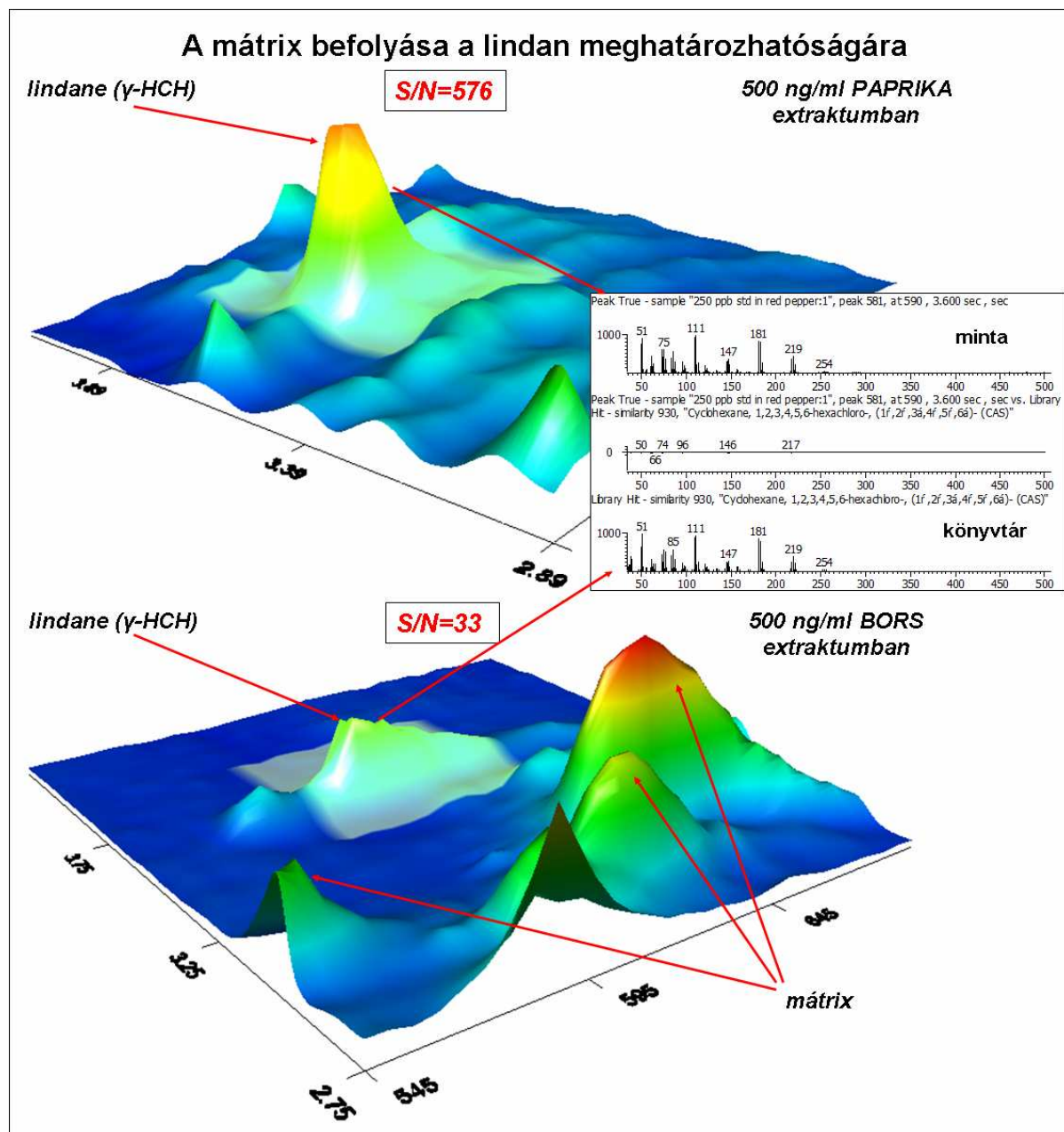
Az egy és kétdimenziós elválasztás közti különbséget jól szemlélteti a **25. ábra**, amin jól látszik a keresett peszticidek és a mátrixkomponensek közti jelentős intenzitás különbség is.



25. ábra GC×GC technika elválasztási potenciáljának példája:
háromdimenziós GC×GC TOFMS kromatogram 500 ng/ml sztenderd keverék
paprika extraktumban

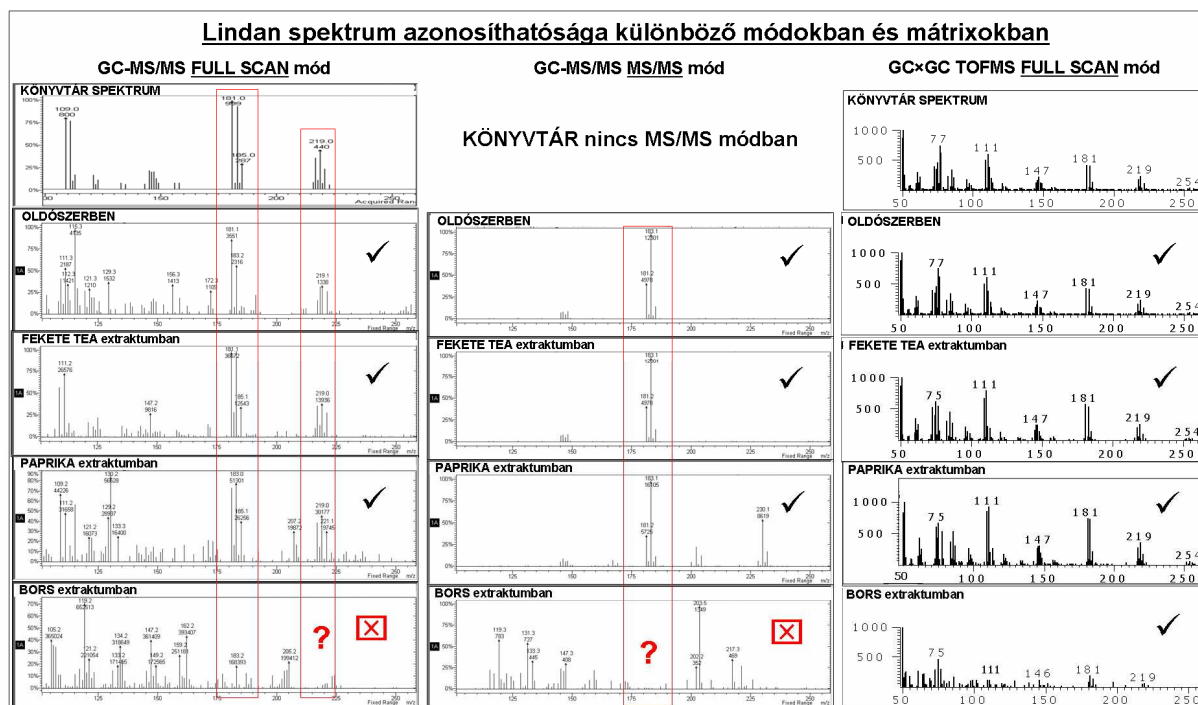
Ha az összes csúcs egydimenzióba való konvertálását tekintjük, akkor látszik, hogy a keresett peszticideket a mátrix teljesen elfedi.

A fekete bors mérésének nehézségét mutatja az is, hogy még 500 ng/ml koncentrációban sem lehetett kimutatni a chlorothalonil-t és az endosulfan sulfate-ot. Továbbá a lindan érzéketlen fekete bors extraktumban, de érzékeny paprika extraktumban, amit a **26. ábrán** mutatok be.



26. ábra Paprika és bors mátrix befolyása a lindane meghatározhatóságára

A ko-eluálódó mátrixkomponensek másik kedvezőtlen hatása, hogy torzítani tudják a spektrumot, melyet a **27. ábrán**, a lindan példáján szemléltetnek.



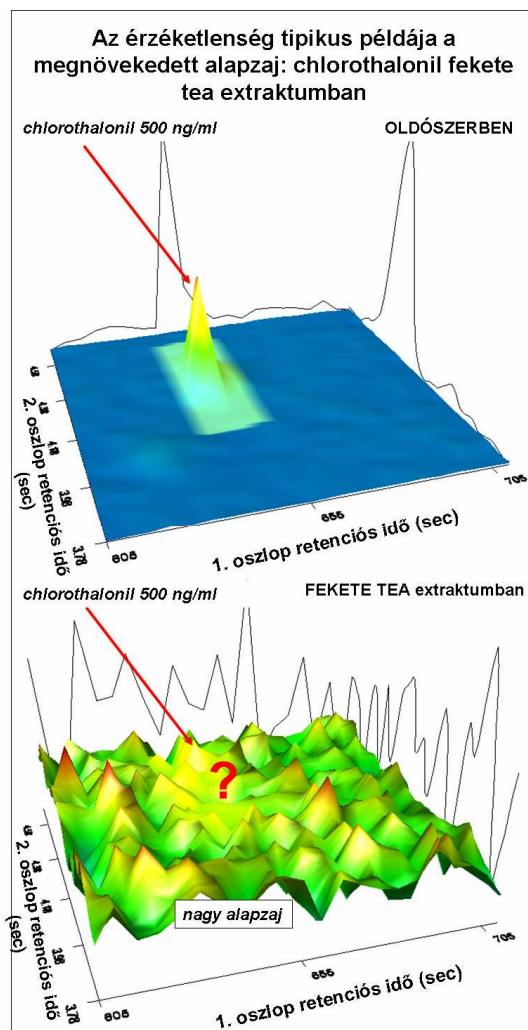
27. ábra Lindan (100 ng/ml koncentráció minden injektált mintában)
azonosítási lehetőségei spektrumkönyvtárakból

A GC-MS/MS teljes pásztázási módban nem tudja azonosítani a lindan-t fekete borsban a 219-es ion hiánya miatt. A minta annyira megemeli az ionhátteret, hogy az még a háttérkivonás funkcióval sem eliminálható. Az MS/MS mód tisztább spektrumokat eredményez, de csak a spektrumok egymáshoz való hasonlítása lehetséges, mert spektrumkönyvtár nem áll rendelkezésre. A fekete bors itt is különbözik a többitől. Két dimenzióban azonban a teljes elválasztás miatt a spektrum alapján azonosítható, bár a relatív ion intenzitás értékek alacsonyabbak, ami abból is adódik, hogy a 100 ng/ml már kimutatás körüli koncentráció fekete borsban.

A fekete bors extraktum a GC×GC rendszert beszennyezi, amit tapasztalataim szerint oldószer 15-szöri injektálása és magas hőmérsékletű fűtés alkalmazása tisztítani tud. A paprika extraktummal ilyen probléma nem lépett fel.

5.4.5.2 Tea

A tea extraktum ránézésre is sokkal tisztábbnak tűnt, amit alátámasztottak a mérési eredmények, és az is, hogy 5 tea minta mérése után sem maradt maradandó szennyeződés sem az egy sem a kétdimenziós rendszeren. A mátrix-hatás komponensenként véletlenszerű volt, a chlorothalonil kiugróan magas jelerősödést mutatott (lásd **5. táblázat**). GC-MS/MS rendszeren paprika mintában is közel 200 %-os jelerősödés volt megfigyelhető erre a peszticidre, tea mintában ennek a háromszorosát (>600 %) tapasztaltam. Ugyanakkor GC×GC esetén olyan mértékű érzékenység csökkenést tapasztaltam, hogy a chlorothalonil-t nem lehetett meghatározni tea extraktumban még 500 ng/ml koncentrációban sem, amit a **28. ábrán** szemléltetek.



28. ábra Az érzéketlenség tipikus példája a megnövekedett alapzaj: chlorothalonil fekete tea extraktumban

Ennek oka a tea mátrix okozta alapvonal növekedés annak ellenére, hogy láthatóan semmilyen mátrix csúcs nem zavarná a chlorothalonil azonosítását.

Általánosságban elmondható, hogy a mátrixok csak kis retencióbeli csúszásokat eredményeznek, melyek számszerű adatait a **mellékletek / 10. táblázatában** foglaltam.

5.4.6 Fő analitikai paraméterek

5.4.6.1 Linearitás

A linearitást 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 és 500 ng/ml sztenderd keverék oldatok (oldószerben és mátrixban) mérésével teszteltem. A kalibrációs egyenesek adatait a **mellékletek / 11. és 12. táblázata** tartalmazza.

A koncentráció-jel összefüggés lineáris volt a kimutatási határ-500 ng/ml tartományban. A chlorothalonil ilyen szempontból is problémás volt, GC×GC TOFMS-sel az érzéketlenség miatt nem lehetett kalibrációt állítani, míg GC-MS/MS-sel csak a ko-eluálódó mátrix okozta jelnövekedés miatt lehetett felvenni azt. A lineáris tartomány alsó határa maga a kimutatási határ, ami chlorothalonil esetében oldószerben igen magas (100 ng/ml), ami csak hárompontos kalibráció felvételét teszi lehetővé. Az endosulfan beta mérését pedig a paprikaminta ko-eluálódó mátrix alkotói gátolják. A legfeltűnőbb különbség a két technika között az általában 5-20-szoros érzékenység különbség a GC-MS/MS technika javára, de ez nem jelent rosszabb kimutatási határt (lásd a **mellékletek / 13. táblázatában**).

5.4.6.2 Kinyerési hatások

Mivel a kinyerési hatások elméletileg független az alkalmazott mérés technikától, ezt csak GC-MS/MS-sel vizsgáltam. A száraz mintákat 1 mg/kg koncentrációra dúsítottam, és a tízszeres hígítás miatt az injektált extraktumban várható koncentráció 100 ng/ml volt. A mátrix-hatást mátrix-

illesztett kalibrációval (10-500 ng/ml) kompenzáltam, ami a dúsítási szintnek és a mérhető koncentrációnak is megfelelő. A kinyerési hatások átlagos értékeit a **mellékletek / 14. táblázatában** foglaltam össze.

A hagyományos és közvetlen dúsítás eredményei hasonlóak, bár a közvetlen dúsítás értékei kissé magasabbak, ami a hagyományos dúsítás hosszabb folyamata miatti veszteséget bizonyítja. Míg a fekete tea mintára kapott szórás értékek alacsonyak, addig a paprika minta inhomogenitást mutatott. Továbbá az endosulfan beta komponensre nem kaptam értékelhető eredményt paprika mintában a mátrix nagymértékű jelcsökkentő hatása miatt. Az endosulfan alpha és beta izomerek, a bomlástermékük pedig az endosulfan sulfate, és mivel az endosulfan alpha és endosulfan sulfate kinyerési hatásfoka elfogadható és ezzel közel azonos a fekete tea mintában, ezért a paprika mintában is hasonló kinyerési hatások várható az alkalmazott minta-előkészítési technikával. A chlorothalonil paprika és a lindan fekete tea mintában mutatott szisztematikusan alacsony (<40 %) kinyerhetőséget, ezért mennyiségi mérésükkor ezzel mindenképpen kalkulálni kell.

5.4.6.3 Kimutatási határ (LOD) – mennyiségi mérés határok (LOQ)

A kimutatási és a mennyiségi méréshatárokat alacsony koncentrációjú sztenderd oldatok mérésével határoztam meg. Ahol a jel/zaj arány 3 illetve 10 volt, azt kimutatási határnak illetve a mennyiségi meghatározás határának definiáltam. Az eredményeket a **mellékletek / 13. táblázatba** foglaltam.

A chlorothalonil érzéketlen volt oldószerben, ami azt bizonyítja, hogy nagy affinitás jellemzi a liner aktív helyeihez való kötődés tekintetében. A GC×GC TOFMS-re vonatkozó eredmények kissé magasabbak, de figyelembe véve azt, hogy 2 µl került injektálásra a GC-MS/MS-nél alkalmazott 10 µl helyett, a GC×GC TOFMS rendszer érzékenyebb ezekre a komponensekre egységnyi injektált mintatérfogatra vonatkoztatva. Természetesen az injektált mennyiségnek határt szab, hogy a lehető legkevesebb mátrix bejuttatásával kell elérni a lehetőleg alacsony kimutatási határt és mennyiségi meghatározás határokat. Komplex rendszereknél, mint a GC×GC TOFMS, érdemes kevesebb mátrixot juttatni a rendszerbe. Összehasonlításképpen 10 µl nagy víztartalmú zöldség vagy gyümölcsminta „acetát-pufferelt QuEChERS” extraktuma (1 ml extraktum reprezentál 1 g mintát) 10 mg mintát jelent az oszlopon. Ezzel szemben a jelen minta-előkészítéssel a GC-MS/MS rendszerbe 1 mg, a GC×GC TOFMS rendszerbe 0.2 mg mintának megfelelő extraktum kerül, ami 10 illetve 50-szer kevesebb, mint az „acetát-pufferelt QuEChERS” esetén. Az LOD és LOQ értékek ebben a formában nem összevethetőek az aktuális MRL értékekkel, ezért ezeket extrapoláltam bemért mintára és összevettem az EU, a Codex Alimentarius Commission által szabott határértékekkel és, hogy a peszticid Kínában vagy Indiában engedélyezve van-e. Ezt a **mellékletek / 15. táblázatba** foglaltam össze.

A *chlorothalonil* 2 illetve 70 mg/kg határértéke paprikában elegendően magas, a meghatározási határ tökéletesen teljesíti ezt mindkét technikával. Tea mintákban azonban csak GC-MS/MS rendszerrel határozható meg a vizsgált koncentráció-tartományban és a GC-MS/MS-sel sem tudja teljesíteni az EU által szabott alacsony MRL értéket. A chlorothalonil használata Kínában és Indiában is engedélyezett, ezért valódi szennyező lehet ezekből az országokból érkező (főként) tea mintákban.

Az *endosulfan alpha*, *endosulphan beta* és *endosulfan sulfate* hatóanyagokra - azért mert izomerek és bomlástermék lévén hasonló szerkezetűek -, az MRL rájuk együttesen vonatkozik. Az EU által szabott 1 mg/kg határértéket GC-MS/MS-sel nem lehet tartani, mert ez endosulfan beta-ra igen érzéketlen és GC×GC TOFMS-sel is 1.1 mg/kg az a legkisebb koncentráció, amit mennyiségileg mérni lehet. Ebből a szempontból az endosulfan-ok paprikából való mérésére a GC×GC TOFMS hatékonyabb. Az endosulfan-ok szintén lehetséges szennyező komponensek lehetnek a Kínából és Indiából származó tea mintákban, mert engedélyezettek, de a magas határértékek miatt mérésük nem jelent gondot egyik technikával sem.

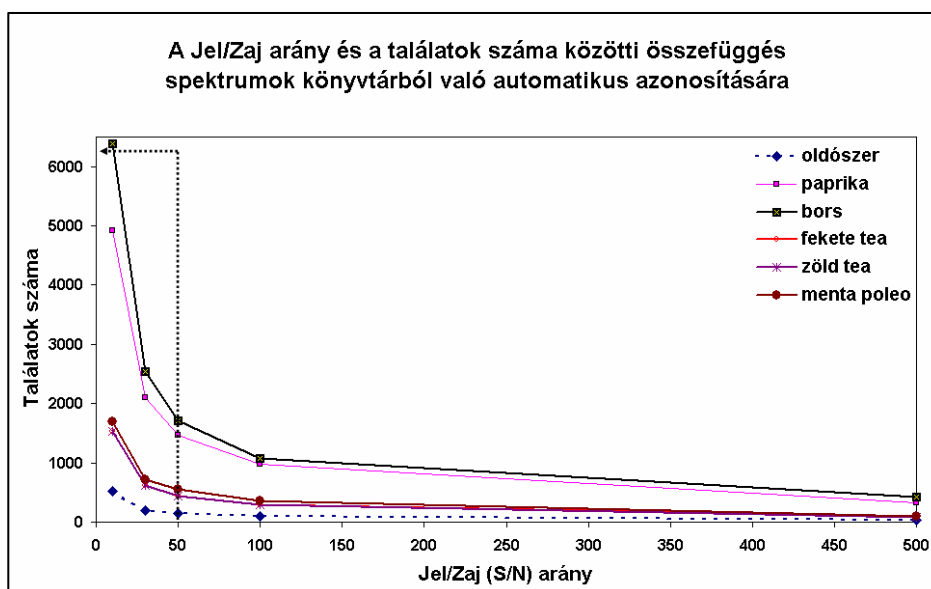
Egyik műszer sem felel meg a *lindan* mérésére vonatkozó alacsony EU-határértéknek (0.01 mg/kg), és ha a minta esetlegesen a határértéknél nagyobb, de a mennyiségi meghatározás határnál alacsonyabb koncentrációban (0.01-0.05 mg/kg) tartalmaz lindan-t, az analitikus negatívnak ítélné meg, holott az már a határértéket is meghaladta. A lindan lehetséges veszélyforrás Indiából.

A *vinclozolin* mennyiségi kimutatásának határa teában csak GC×GC TOFMS technikával (0.015 mg/kg) haladja meg kissé a rá szabott EU-határértéket (0.01 mg/kg) és Kínában engedélyezett.

5.4.7 Nem-célkomponensek keresése GC×GC TOFMS műszerrel

Kétségtelen, hogy a GC×GC TOFMS előnye a GC-MS/MS-hez képest a hatékonyabb elválasztáson túl a TOFMS teljes pásztázási módja. (A GC-MS/MS is működik teljes pásztázás módban, de a sebessége csak tizede a TOFMS-ének.) A GC×GC TOFMS által felvett kétdimenziós kromatogram ezért minden információt tartalmaz, ami EI-vel ionizálható és a mintában van. Azt, hogy ebből mi válik láthatóvá a kromatogramon és hogy milyen komponenseket lehet azonosítani, az analitikustól függ. A spektrumkönyvtár (ak), amiből a szoftver az azonosítást végzi, a jel/zaj arány és a minimális egyezési faktor is fontos paraméterek, melyeket az analitikus állít be. A

minimális egyezési faktort (0-1000) ebben a tanulmányban 600-ra állítottam, ami 60 %-nak felel meg. Ennek emelésével az azonosított komponensek száma nyilvánvalóan csökkenni fog. A hasonló komponensekből (peszticidek, mikotoxinok, antibiotikumok, állatgyógyszerek, stb.) alkotott spektrumkönyvtárak alkalmazása határt szab a „nem-célkomponensek” azonosításának. Ezért a legtöbb komponenst tartalmazó spektrumkönyvtárat (*mainlib*) alkalmaztam, ami a *ChromaTOF*[®] szoftverrel elérhető és több mint 191 000 spektrumot (komponenst) tartalmaz. Úgy találtam, hogy a jel/zaj beállítás kritikus paraméter valódi minták mérésénél, ahogy az a **25. ábrán** is látszik, a peszticidek csúcsai eltörpülnek a mátrixból származó csúcsokhoz képest. Az automatikus találatok számának függését a jel/zaj beállításhoz a **29. ábra** szemlélteti.



29. ábra A Jel/Zaj (S/N) értékének beállítása és az automatikus találatok száma közti összefüggés néhány szárított minta extraktuma alapján

A piszkos extraktumot adó mátrixok esetében tapasztalataim szerint a jel/zaj beállítást maximum 50-re érdemes állítani, mert e felett a nagy mátrix háttér miatt nem minden célpeszticidet lehet azonosítani, és információt veszthetünk a nem-célkomponensekről is. A diagram a mátrixok közötti eltérést is jól szemlélteti. A fekete és a zöld tea valamint a menta poleo egymástól nem és az oldószertől is csak kismértékben különböznek a találatok számát illetően. Ezzel szemben a paprika és a fekete bors minták esetén rendkívül megnövekszik a találatok száma, ha alacsony jel/zaj beállítást használunk,

ami azt bizonyítja, hogy a peszticid csúcsokkal megegyező intenzitású mátrix csúcsok vannak a kromatogramokon. Az egész tanulmányban ezért a jel/zaj arányt 10-re állítottam.

5.4.8 Következtetések

A mátrixhatás kritikus fontosságú mikor alacsony mintatisztítással és/vagy extrém piszkos mintákat mérünk GC technikákkal. A kiválasztott klórtartalmú peszticidek jól reprezentálják a kétdimenziós elválasztás hatékonyságát az egydimenzióshoz képest. Két dimenzióban minden vizsgált peszticid elvált a mátrixtól, ellenben egy dimenzióban a mátrix gyakran fedte a célkomponenseket, ami bár az MS/MS detektálás miatt kevésbé zavarta az azonosítást, az ionizációra mindenképpen hatással volt. Az endosulfan beta volt az egyetlen, amit nem lehetett meghatározni GC-MS/MS-sel paprika mintában. GC×GC TOFMS-sel csak a chlorothalonil teában való meghatározásakor ütköztem problémába, mert a mátrix a teljes elválasztás ellenére megnövelte az alapvonalat. Csak a GC-MS/MS technika nem volt alkalmas, hogy az endosulfan-okat az EU MRL szinten meghatározza. Azon túl, hogy ez egy érzékeny technika, a GC×GC TOFMS-hez képest vannak hátrányai. A GC-MS/MS-t is lehet teljes pásztázás módban működtetni, de a nagy háttérrel adó mátrixok mérésénél a nem-célkomponensek azonosítása nem lehetséges, mert a nyerhető spektrumokat gyakran torzítja a ko-eluálódó mátrixkomponens. A GC×GC TOFMS egy hiányossága, hogy nem lehet kémiai ionizációs módban működtetni. Ennek ellenére is nagy potenciállal rendelkezik mind az elválasztás, mind a cél és nem-célkomponensek detektálása terén, ezért az élelmiszer-analitikában való alkalmazása - főleg a folyékony minták, melyek nem igényelnek minta-előkészítést vagy csak elő-koncentrációt, amely nagy háttérrel eredményez -, várható a közeljövőben.

6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Nagyszámú (>150) peszticidre mérésére alkalmas LC-MS/MS módszert fejlesztettem és meghatároztam a módszer analitikai tulajdonságait, korlátait, valamint teszteltem az „acetát-pufferelt QuEChERS” minta-előkészítés alkalmazhatóságát.

Ennek során megállapítható, hogy:

a) a fejlesztett módszer 150 peszticidre megfelelő, 10 komponensre pedig kis érzékenységet mutat.

b) az „acetát-pufferelt QuEChERS” minta-előkészítés alkalmas nagyszámú peszticid nagy víztartalmú mintákból való kivonására; a kinyerési hatásfokok 70 és 120 % közöttiek a vizsgált peszticidek >90 %-ánál.

c) a kidolgozott módszer validálási paraméterei kielégítik az analitikai követelményeket: a koncentráció-jel összefüggés három nagyságrenden keresztül lineáris; a kimutatási határok 10 ng/kg alattiak és a mérések <20 % szórással teljesíthetők.

2. Vizsgáltam a kidolgozott sokkomponenses módszer kromatográfiás-tömegspektrometriás és analitikai paramétereit.

Ennek során igazoltam, hogy:

a) az oszlop 30-35 °C-os termosztálása ideális a kromatográfiás csúcsok stabilitása szempontjából. Ennél magasabb hőmérséklet alkalmazásának nincs hozadéka, alacsonyabb hőmérséklet vagy szabályozatlan oszlophőmérséklet pedig retenciós zavarokat okozhat, ha a laboratórium hőmérséklete ingadozó.

b) Az ionizációt segítő anyagok hatással vannak a retencióra, de ez a hatás járulékos és általában nem jelentős, amit ennek ellenére figyelembe kell venni, ha a módszerben segédanyagot vált az analitikus.

c) az ammónia-tartalmú módosítók jelentős nyomásemelkedést okoznak az UHPLC oszlopon, ami normál HPLC pumpával nem kivitelezhető. UHPLC

alkalmazás hangyasav módosítóval megoldható, a HPLC alkalmazáshoz hasonló kimutatási határok, linearitás és robusztusság mellett.

d) az ammónia-tartalmú módosítók sok esetben pozitívan, néhány esetben negatívan befolyásolják a jelintenzitást a hangyasavhoz képest. Mivel a hangyasavval is megfelelő kimutatási határok érhetőek el, ezért ez az ideális ionizációt segítő anyag a sokkomponenses peszticid módszerekhez ESI+ ionizáció mellett.

e) nagyszámú peszticidet tartalmazó mix oldatokban a komponensek erősíthetik, illetve gyengíthetik egymás ionizációját, amely nem csak ko-elúció, de komponens-függő is. Ezért célszerű a lehető legkevesebb peszticidet tartalmazó mix oldatok alkalmazása, ami pásztázó módszerek létjogosultságát erősíti.

3. Kidolgoztam és gyakorlatban alkalmaztam egy 300 peszticid minőségi azonosítására alkalmas és egy ~50 peszticid mennyiségi mérésére alkalmas módszer kombinálásának az elvét.

Ennek során igazoltam, hogy:

a) az elv helyes, logikus és a gyakorlatban alkalmazható. Az EPI módszer alkalmas 300 peszticid minőségi azonosítására sztenderdek nélkül spektrumkönyvtárból, az MRM módszer pedig csak a valóban célpeszticideket méri.

b) a téves pozitív találatok megfelelő analitikai gyakorlattal csökkenthetők, a téves negatív találatok pedig gyakran kimutatási határ közelében vagy ko-elúció következményeként jelentkeznek, ezért a ko-elúcióra fokozottan figyelni kell a kromatogram kézi kiértékelésnél.

c) a kalibrációs egyenesek adataiból létrehozott adatbázis mátrixon belül is nagy szórást produkál, a TPP-re normált adatbázis pedig mátrixok között is esetenként jelentős eltéréseket mutat. Emiatt a határérték közelében mért mintát szükséges a reprezentatív mátrix helyett saját mátrixára is kalibrálni.

d) a rutin alkalmazás eredményeként a 200 minta fele legalább egy peszticiddel (a 300-ból) szennyezett volt, de csak a minták 6 %-ában tapasztaltam határérték túllépést.

4. GC-MS/MS és GC×GC TOFMS technikákat alkalmaztam és hasonlítottam össze néhány klórtartalmú peszticid szárított paprikából és teából való meghatározására.

Ennek során igazoltam, hogy:

a) az egyszerű minta-előkészítés (tízszeres hígítás) megfelelő a klórtartalmú peszticidek kinyerésére fűszermintákból, kivéve a chlorothalonil-t, mely paprikában és a lindan-t, ami teában mutat alacsony kinyerhetőséget.

b) a GC-MS/MS teljes pásztázás (full scan) módban nem, míg MS/MS módban is csak mérsékelten alkalmas a vizsgált komponensek mérésére, melynek oka a nagy mennyiségű ko-eluálódó mátrixalkotó.

c) a GC×GC TOFMS-sel teljes detektálás lehetséges. Mátrixhatás itt is fellép, de a meghatározhatóságot kevésbé zavarja.

d) a GC×GC TOFMS technika a teljes pásztázás mód és a teljes elválasztás miatt, rendkívül nagy potenciállal rendelkezik a nem-célkomponensek azonosítását tekintve.

e) egyszerű mátrixok mérésénél, ahol az egydimenziós elválasztás megfelelő, nincs értelme kétdimenziós elválasztás alkalmazásának. Ellenben ismeretlen és/vagy nagy mátrix háttérrel eredményező minták esetében ez utóbbi technika előnyösebb.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során a sokkomponenses peszticid meghatározási módszerek lehetőségeire, azok analitikai korlátainak felkutatására és az extrakciós módszer – mátrix - analitikai méréstechnika harmonizálására fektettem a hangsúlyt. Dolgozatom ezek alapján négy nagy - egymástól nem teljesen független - egységből áll.

Először egy 160 peszticid meghatározására alkalmas HPLC-MS/MS módszert dolgoztam ki és teszteltem az „acetát-pufferelt QuEChERS” minta-előkészítési módszer alkalmazhatóságát (kinyerési hatásfok), illetve a rendszerre jellemző analitikai-validálási paramétereket, mint a linearitás, kimutatási határ, ismételhetőség.

A második egységben az előzőleg fejlesztett módszer kromatográfiás, ionizációt és analitikai meghatározást befolyásoló tényezőkkel foglalkoztam, szem előtt tartva a gyakorlati alkalmazhatóság szempontjait. Vizsgáltam az ionizációt segítő anyagok hatásait a kromatográfiára, illetve az ionizációra, a módszer konvertálhatóságát HPLC-ről UHPLC alkalmazásra, a nagyszámú peszticidet tartalmazó mixek alkalmazhatóságát és az izobár átmeneteket.

A sokkomponenses mennyiségi módszerek az egy módszerrel mérhető peszticidek számában határokat feszegetnek. Emiatt a harmadik részben kidolgoztam és alkalmaztam két módszer kombinálásának elvét. Eszerint a mintát egy 300 peszticid azonosítására alkalmas minőségi módszerrel mérem, majd, ha a minta a 300 peszticid valamelyikére pozitív volt, egy jóval kevesebb peszticid (~50) mennyiségi mérésére alkalmas módszerrel újramértem és meghatároztam azok koncentrációját. Ezzel kiterjesztettem a mérhető peszticidek számát 300-ra, csökkentettem a mérés szttenderdigényét és további pozitívum, hogy a mintát nem kell újramérni, ha az a pásztázó módszerrel negatív eredményt ad, csökkentve ezzel a mérés időigényét.

A negyedik egységben az első háromtól merőben eltérő témával foglalkoztam. GC-MS/MS és GC×GC TOFMS technikákat hasonlítottam össze néhány klórtartalmú peszticid meghatározására fűszerekből és teából. A kritikus

pontot itt a nagy háttérrel adó szárított mátrixok jelentették, még a szelektív MS/MS detektálás esetén is. A kétdimenziós elválasztást teljes pásztázással ötvöző GC×GC TOFMS technika előnyösnek bizonyult az ilyen összetett mátrixok esetén, mellyel lehetséges a vizsgált peszticidek határérték közeli meghatározása.

8 SUMMARY

I focused my investigations on the possibilities of multiresidue pesticide measurement, their analytical limitations and on the harmonization of the extraction method-matrix-analytical technique. Based on these, my thesis consists of four - not absolutely independent -, parts.

Primarily, I developed an HPLC-MS/MS method for the determination of 160 pesticide residues and I tested the applicability of the „acetate-buffered QuEChERS” method (recovery) and other analytical-validation parameters, like linearity, limits of detection, repeatability.

In the second part, I dealt with the chromatographic, ionization and analytical parameters of the previously developed method. I investigated the effects of the modifiers those can help the ionization and affect the chromatography, the convertability of the method from HPLC to UHPLC application, the applicability of the pesticide standard mixtures containing many compounds and the isobaric transitions.

The number of compounds included in a multiresidue method has limitations. For that reason, in the third part of my thesis, I developed and applied the principle of the combination of two methods. Accordingly, the sample is measured by a 300-pesticides qualitative method and, if the sample is positive for minimum 1 of the 300, it is re-measured with the second method. This is suitable for the quantitative determination of ~50 pesticides. With this combination, I extended the number of measurable pesticides up to 300, I decreased the standard consumption of the analysis and another advantage is that we do not need to re-measure the sample if it was negative for all the 300 target pesticide residues. With this technique, I increased the capacity of the measurement and decreased the time consumption.

In the fourth part, I focused on a topic that is quite distinct for the first three. I compared the applicability of GC-MS/MS and GC×GC TOFMS techniques for the determination of some chlorinated pesticides from dry spices and tea. The high matrix background was a difficulty even with the selective MS/MS

detection. The combination of the two-dimensional separation with the full scan mode is proved to be beneficial with difficult matrices and the determination of the selected pesticides is possible with this technique.

9 IRODALOMJEGYZÉK

- ADAHCHOUR M., BEENS J., VREULS R.J.J., BRINKMAN U.A.T. (2006) Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) III. Applications for petrochemicals and organohalogenes *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 7
- ADAHCHOUR M., BEENS J., VREULS R.J.J., BRINKMAN U.A.T. (2006) Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) IV. Further applications, conclusions and perspectives *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 8
- AGÜERA A., PIEDRA L., HERNANDO M.D., FERNÁNDEZ-ALBA A.R., CONTRERAS M. (2000) Splitless large-volume GC-MS injection for the analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in vegetables using a miniaturised ethyl acetate extraction *Analyst* 125 1397–1402
- ALDER L., GREULICH K., KEMPE G., VIETH B. (2006) Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 838– 865
- ANASTASSIADES M., LEHOTAY S.J., STAJNBAHER D., SCHENCK F.J. (2003) Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce *Journal of AOAC International* 86, 2, 412
- ANASTASSIADES M., MASTOVSKÁ K., LEHOTAY S.J. (2003) Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides *Journal of Chromatography A*, 1015 163–184
- ANASTASSIADES M., SCHERBAUM E., TAS, DELEN B., STAJNBAHER D. (2007) *Crop Protection, Public Health, Environmental Safety* (szerkesztők: Ohkawa H., Miyagawa H., Lee P.W.) Wiley-VCH, Weinheim, Németország, 439
- ANGIONI A., GARAU V.L., DEL REAL A.A., MELIS M., MINELLI E.V., TUBEROSO C., CABRAS P. (2003) GC-ITMS determination and degradation of captan during winemaking *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (23), 6761–6766

- BANERJEE K., OULKAR D.P., DASGUPTA S., PATIL S.B., PATIL S.H., SAVANT R., ADSULE P.G. (2007) Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1173 98–109
- BANERJEE K., PATIL S.H., DASGUPTA S., OULKAR D.P., PATIL S.B., SAVANT R., ADSULE P.G. (2008) Optimization of separation and detection conditions for the multiresidue analysis of pesticides in grapes by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1190 350–357
- BARKER S.A., LONG A.R., SHORT C.R. (1989) Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion *Journal of Chromatography* 475 353-361
- BECKER V.G. (1971) Gaschromatographische simultanbestimmung von chlorierten Kohlenwasserstoffen und phosphorsäureestern in pflanzlichen material *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 4, 125-126
- BOGIALLI S., DI CORCIA A. (2007) Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 163–179
- BRINKMAN U.A.T., ONEL P.M., DE VRIES G. (1979) Application of the electron-capture detector in liquid chromatography *Journal of Chromatography A*, 171, 424-430
- CAIRNS T., CHIU K. S., NAVARRO D., SIEGMUND E. (1993) Multiresidue pesticide analysis by ion-trap mass spectrometry *Rapid communications in mass spectrometry* 7 971-988
- CAJKA T., HAJŠLOVÁ J. (2004) Gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis: advantages and limitations *Journal of Chromatography A*, 1058, 251-261
- CARABIAS MARTÍNEZ R., RODRÍGUEZ GONZALO E., GARCÍA JIMÉNEZ M.G., GARCÍA PINTO C., PÉREZ PAVÓN J.L., HERNÁNDEZ MENDEZ J. (1996) Determination of the fungicides folpet, captan, and captafol by cloud-point preconcentration and high-performance liquid

- chromatography with electrochemical detection *Journal of Chromatography A*, 754, 85-96
- CHALER R., VILANOVA R., SANTIAGO-SILVA M., FERNANDEZ P., GRIMALT J.O. (1998) Enhanced sensitivity in the analysis of trace organochlorine compounds by negative-ion mass spectrometry with ammonia as reagent gas *Journal of Chromatography A*, 823, 73-79
- CHEN S., SHI L., SHAN Z., HU Q. (2007) Determination of organochlorine pesticide residues in rice and human and fish fat by simplified two-dimensional gas chromatography *Food Chemistry* 104 1315–1319
- CHU X.G., HU X.Z., YAO H.Y. (2005) Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection *Journal of Chromatography A*, 1063 201–210
- CUNHA S.C., FERNANDES J.O., ALVES A., OLIVEIRA M.B.P.P. (2009) Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines *Journal of Chromatography A*, 1216 119–126
- CUNHA S.C., FERNANDES J.O., OLIVEIRA M.B.P.P. (2009) Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid–liquid microextraction and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1216, 8835-8844
- CUNHA S.C., LEHOTAY S.J., MASTOVSKA K., FERNANDES J.O., BEATRIZ M., OLIVEIRA P.P. (2010) Sample Preparation Approaches for the Analysis of Pesticide Residues in Olives and Olive Oils *Health and Disease Prevention* 653-666
- DALLÜGE J., VAN RIJN M., BEENS J., VREULS R.J.J., BRINKMAN U.A.T. (2002) Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-offlight mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts *Journal of Chromatography A*, 965 207–217
- DE KOK A. (1994) "Multiresidue methods used in The Netherlands and residue data obtained in 1993", Proceedings of the *3rd International Seminar on Pesticide Residues*, Almeria, Spanyolország, 87–113

- DE KOK A., HIEMSTRA M. (1992) *Journal of OAC International* 75 1063–1072
- DE KOK A., HIEMSTRA M., VREEKER C.P. (1987) *Chromatographia* 24, 469–476
- DE KOK A., VREEKER C.P., BESAMUSCA E.W., TOONEN A.A., HIEMSTRA M. (1995) “Evaluation, validation and practical application of GC-ITD for routine pesticide residue analysis in fruits and vegetables”, Current Status and Future Trends in Analytical Food Chemistry, Proceedings of the *Eighth European Conference on Food Chemistry* (Euro Food Chem VIII), Vol. 2, Vienna, Austria, pp 415–418
- DFG Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, VCH, Weinheim, Germany, S8, DFG-S19
- DI MUCCIO A., DOMMARCO R., BARBINI D.A., SANTILIO A., GIROLIMETTI S., AUSILI A., VENTRIGLIA M., GENERALI T., VERGORI L. (1993) Application of solid-phase partition cartridges in the determination of fungicide residues in vegetable samples *Journal of Chromatography A*, 643, 363-368
- DICKES G.J. (1979) The application of gas chromatography to food analysis *Talanta*, 26, 1065-1099
- FERNANDEZ-ALBA A.R., VALVERDE A., AGÜERA A., CONTRERAS M. (1994) Gas chromatographic determination of organochlorine and pyrethroid pesticides of horticultural concern *Journal of Chromatography A*, 686, 263-274
- FERNÁNDEZ-ALBA A.R., GARCÍA-REYES J.F. (2008) Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 11.
- FERRER C., GÓMEZ M.J., GARCÍA-REYES J.F. FERRER I., THURMAN E.M., FERNÁNDEZ-ALBA A.R. (2005) Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1069 183–194
- FILLION J., SAUVÉ F., SELWYN J. (2000) Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by

- gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection *Journal of AOAC International* 83, 3, 698
- GARCÍA-REYES J.F., FERRER C., GÓMEZ-RAMOS M.J., MOLINA-DÍAZ A., FERNÁNDEZ-ALBA A.R. (2007) Determination of pesticide residues in olive oil and olives *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 3
- GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION (1996) Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, 6. kiadás, I. rész, Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague, The Netherlands
- GILBERT-LÓPEZ B., GARCÍA-REYES J.F., MOLINA-DÍAZ A. (2009) Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review *Talanta* 79 109–128
- GONÇALVES C., ALPENDURADA M.F. (2004) Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities *Journal of Chromatography A*, 1026, 239-250
- GOTO T., ITO Y., OKAA H., SAITO I., MATSUMOTO H., NAKAZAWA H. (2003) Simple and rapid determination of N-methylcarbamate pesticides in citrus fruits by electrospray ionization tandem mass spectrometry *Analytica Chimica Acta*, 487 201–209
- GRANBY K., ANDERSEN J.H., CHRISTENSEN H.B. (2004) Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Analytica Chimica Acta*, 520, 165-176
- GULVYDIS D.M., WLATERS S.M. (1991) Gas chromatographic determination of captan, folpet and captafol residues in tomatoes, cucumbers and apples using wide-bore capillary column: interlaboratory study *Journal – Asociacion of Official Chemists* 74, 830-835
- HERCEGOVÁ A., DÖMÖTÖROVÁ M., MATISOVÁ E. (2007) Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination *Journal of Chromatography A*, 1153 54–73

- HERNÁNDEZ F., POZO O.J., SANCHO J.V., LÓPEZ F.J., MARÍN J.M., IBÁÑEZ M. (2005) Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS² using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 7
- HERNANDO M.D., PIEDRA L., BELMONTE Á., AGÜERA A., FERNÁNDEZ-ALBA A.R. (2001) Determination of traces of five antifouling agents in water by gas chromatography with positive/negative chemical ionisation and tandem mass spectrometric detection *Journal of Chromatography A*, 938, 103-111
- HERNANDO M.D., SUÁREZ-BARCENA J.M., BUENO M.J.M., GARCIA-REYES J.F., FERNÁNDEZ-ALBA A.R. (2007) Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food *Journal of Chromatography A*, 1155 62-73
- HERRERO M., IBÁÑEZ E., CIFUENTES A., BERNAL J. (2009) Multidimensional chromatography in food analysis *Journal of Chromatography A*, 1216, 7110-7129
- HIEMSTRA M., JOOSTEN J.A., DE KOK A. (1995) *Journal of AOAC International* 78 1267-1274
- HIEMSTRA M., TOONEN A.A., DE KOK A. (1999) *Journal of AOAC International* 82 1198-1205
- HILL A.R., HARRIS C.A., WARBURTON A.G. (2000) in Principles and Practices of Method Validation, (szerkesztők: Fajgelj A. & Ambrus Á.), *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK, 41-48
- JANSSON C., PIHLSTRÖM T., ÖSTERDAHL B.G., MARKIDES K.E. (2004) A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection *Journal of Chromatography A*, 1023 93-104
- KLEIN J., ALDER L. (2003) Applicability of Gradient Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry to the Simultaneous Screening for About 100 Pesticides in Crops *Journal of AOAC International* 86, 5, 1015

- KLOEPFER A., QUINTANA J.B., REEMTSMA T. **(2005)** Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples *Journal of Chromatography A*, 1067, 153-160
- KMELLÁR B., FODOR P., PAREJA L., FERRER C., MARTÍNEZ-UROZ M.A., VALVERDE A., FERNANDEZ-ALBA A.R. **(2008)** Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1215 37–50
- KMELLÁR B., ABRANKÓ L., FODOR P., LEHOTAY S.J. **(2010)** Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) *Food additives and Contaminant*, 1-16.
- KMELLÁR B., PAREJA L., FERRER C., FODOR P., FERNÁNDEZ-ALBA A.R. **(2010)** Study of the effects of operational parameters on multiresidue pesticide analysis by LC-MS/MS *Talanta (nyomtatás alatt)*, DOI: 10.1016/j.talanta.2010.12.006
- KOINECKE A., KREUZIG R., BAHADIR M., SIEBERS J., NOLTING H.J. **(1994)** Investigations on the substitution of dicloromethane in pesticide residue analysis of plant materials *Freusenius Journal of Analytical Chemistry*, 349, 301-305
- KRUBE A., KÜNNAPAS A., HERODES K., LEITO I. **(2008)** Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1187 58-66
- LEHOTAY S.J., DE KOK A., HIEMSTRA M., VAN BODEGRAVEN P. **(2005)** Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection *Journal of AOAC International* 88, 2, 595
- LEHOTAY S.J., MASTOVSKÁ K., LIGHTFIELD A.R. **(2005)** Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables *Journal of AOAC International* 88, 2, 615

- LEHOTAY S.J., MASTOVSKÁ K., YUN S.J. (2005) Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes *Journal of AOAC International* 88, 2, 630
- LESUEUR C., KNITTL P., GARTNER M., MENTLER A., FUERHACKER M. (2008) Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method *Food Control*, 19 906–914
- LIU Z., PHILLIPS J.B. (1991) Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface *Journal of Chromatographic Science* 29 227-231
- LUKE M. A., FROBERG J. E. MASUMOTO H. T. (1975) Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 58 1020-1026
- LUKE M.A. FROBERG J.E., DOOSE G.M., MASUMOTO H.T. (1981) Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 64 1187-1195
- MANIRAKIZA P., COVACI A., SCHEPENS P. (2000) Single Step Clean-Up and GC-MS Quantification of Organochlorine Pesticide Residues in Spice Powder *Chromatographia* 52, 11/12
- MASTOVSKÁ K., HAJŠLOVÁ J., LEHOTAY S.J. (2004) Ruggedness and other performance characteristics of low-pressure gas chromatography–mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in food crops *Journal of Chromatography A*, 1054 335–349
- MASTOVSKÁ K., LEHOTAY S.J. (2004) Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues *Journal of Chromatography A*, 1040 259–272
- MEI H., HSIEH Y., NARDO C., XU X., WANG S., NG K., KORFMACHER W.A. (2003) Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric assays:

- Application to drug discovery. *Rapid Communication of Mass Spectrometry* 17 97–103.
- MEZCUA M., MARTÍNEZ-UROZ M.A., WYLIE P.L., FERNÁNDEZ-ALBA A.R. (2009) Simultaneous screening and target analytical approach by gas chromatography-quadrupole-mass spectrometry for pesticide residues in fruits and vegetables *Journal of AOAC International* 92, 6, 1790
- MILLS P.A., ONLEY J.J., GAITHER R.A. (1963) Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods *Journal - Association of Official Agricultural Chemists*, 46, 186-191.
- NGUYEN T.D., YU J.E., LEE D.M., LEE G.H. (2008) A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry *Food Chemistry* 110 207–213
- NIESSEN W.M.A. (2005) MASS SPECTROMETRY | Electrospray *Encyclopedia of Analytical Science*, 373-379
- OKIHASHI M., TAKATORI S., KITAGAWA Y., TANAKA Y. (2007) Simultaneous Analysis of 260 Pesticide Residues in Agricultural Products by Gas Chromatography/Triple Quadrupole Mass Spectrometry *Journal of AOAC International* 90, 4, 1165
- PATEL K., FUSSELL R.J., MACARTHUR R., GOODALL D.M., KEELY B.J. (2004) Method validation of resistive heating—gas chromatography with flame photometric detection for the rapid screening of organophosphorus pesticides in fruit and vegetables *Journal of Chromatography A*, 1046, 225-234
- RAMESH A., RAVI P.E. (2004) Electron ionization gas chromatography–mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood *Journal of Chromatography B*, 802, 371-376
- ROMERO-GONZÁLEZ R., GARRIDO FRENICH A., MARTÍNEZ VIDAL J.L. (2008) Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry *Talanta*, 76 211–225

- ROOS A.H., VAN MUNSTEREN A.J., NAB F.M., TUINSTRA L.G.M.T. (1987) Universal extraction/clean-up procedure for screening of pesticides by extraction with ethyl acetate and size exclusion chromatography *Analytica Chimica Acta*, 196, 95-102
- RUSSO M.V., CAMPANELLA L., AVINO P. (2002) Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissues by capillary gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry analysis *Journal of Chromatography B*, 780, 431-441
- SCHENCK F.J., LEHOTAY S.J. (2000) Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? *Journal of Chromatography A*, 868 51–61
- SOLER C., MANES J., PICÓ Y. (2004) Liquid chromatography–electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits *Journal of Chromatography A*, 1048 41–49
- SOLER C., MANES J., PICÓ Y. (2005) Comparison of liquid chromatography using triple quadrupole and quadrupole ion trap mass analyzers to determine pesticide residues in oranges *Journal of Chromatography A*, 1067 115–125
- SOLER C., MANES J., PICÓ Y. (2005) Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits *Journal of Chromatography A*, 1088 224–233
- SÖDERGREN A. (1978) Simultaneous detection of halogenated and other compounds by electron-capture and flame-ionization detectors combined in series *Journal of Chromatography A*, 160, 271-276
- SPECHT W., PELZ S., GILSBACH W. (1995) Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica gel-column chromatography *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 353, 183-190
- SPECHT W., TILKES M. (1980) Gaschromatographische bestimmung von rückständen an pflanzenbehandlungsmitteln nach clean-up über gel-chromatographie und minikieselgel-säulen-chromatographie, 3. Mitt.: methode zur aufarbeitung von lebensmitteln und futtermitteln pflanzlicher und tierischer herkunft für die multirückstandsbestimmung

- lipoid- und wasser löslicher pflanzenbehandlungsmittel *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 301, 300-307.
- STAN H.J. (2000) Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation *Journal of Chromatography A*, 892, 347-377
- STORHERR R.W., OTT P., WATTS R.R. (1971) A general method for organophosphorus pesticide residues in nonfatty foods *Journal – Association of Official Agricultural Chemists*, 54, 513-516.
- TAKINO M., DAISHIMA S., NAKAHARA T. (2003) Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1011, 67-75
- TELLING G.M., SISSONS D.J., BRINKMAN H.W. (1977) Determination of organochlorine insecticide residues in fatty foodstuffs using a clean-up technique based on a single column of activated alumina *Journal of Chromatography A*, 137, 405-423
- THURMAN E.M., FERRER I., BARCELÓ D. (2001) Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides *Analytical Chemistry*, 73, 5441-5449
- TOKMANA N., SOLERA C., LA FARRÉ M., PICÓ Y., BARCELÓ D. (2009) Determination of amitraz and its transformation products in pears by ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1216 3138–3146
- WATTS R.R., STORHERR R.W., PARDUE J.R., OSGOOD T. (1969) Charcoal column cleanup method for many organophosphorus pesticide residues in crop extracts *Journal – Association of Official Analytical Chemists*, 52, 522-526
- ZROSTLÍKOVÁ J., HAJŠLOVÁ J., POUŠTKA J., BEGANY P. (2002) Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography– electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials *Journal of Chromatography A*, 973 13–26

internet 1:

<http://www.sulinet.hu/eletestudomany/archiv/1999/9943/ddt/egynobel.htm>

internet 2: <http://www.pesticides-online.com>

internet 3: http://www.fvm.hu/doc/upload/200407/17_1999_eum.pdf

internet 4: [http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991L0414:20070201:EN:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991L0414:20070201:EN:PDF](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991L0414:20070201:EN:PDF)

internet 5:

http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf

internet 6:

http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf

internet 7: [http://www.eurl-](http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=100&Lang=EN)

[pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=100&Lang=EN](http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=100&Lang=EN)

internet 8: [http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:en:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:en:PDF](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:en:PDF)

internet 9: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm

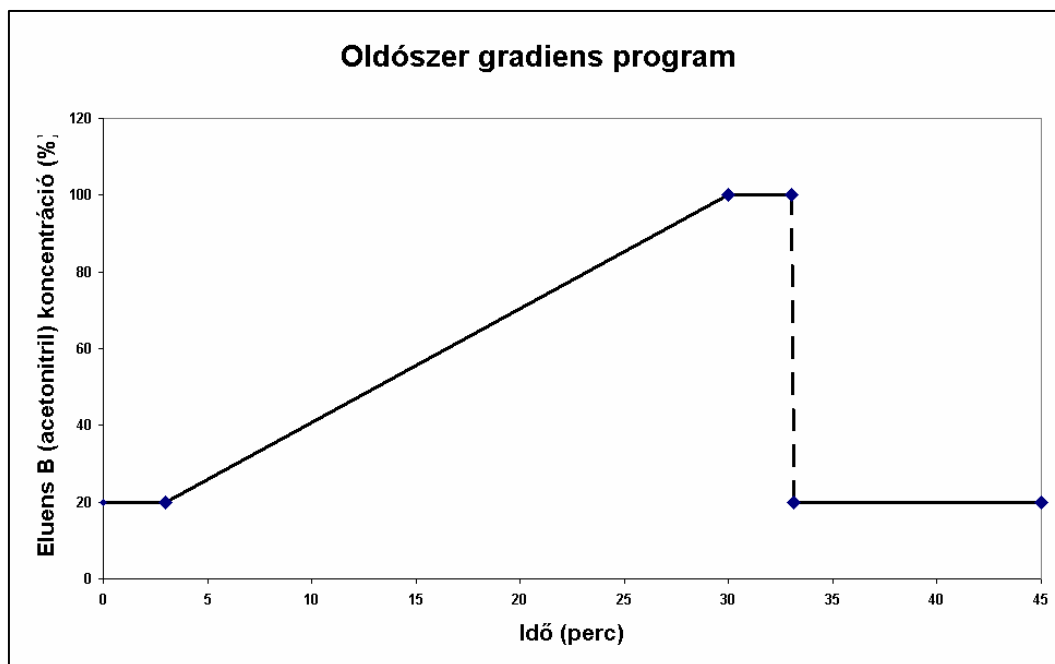
internet 10: <http://www.measurementuncertainty.org/mu/QUAM2000-1.pdf>

internet 11: www.codexalimentarius.net/download/report/701/al31_24e.pdf

internet 12: http://www.absciex.com/LITERATURE/cms_041987.pdf

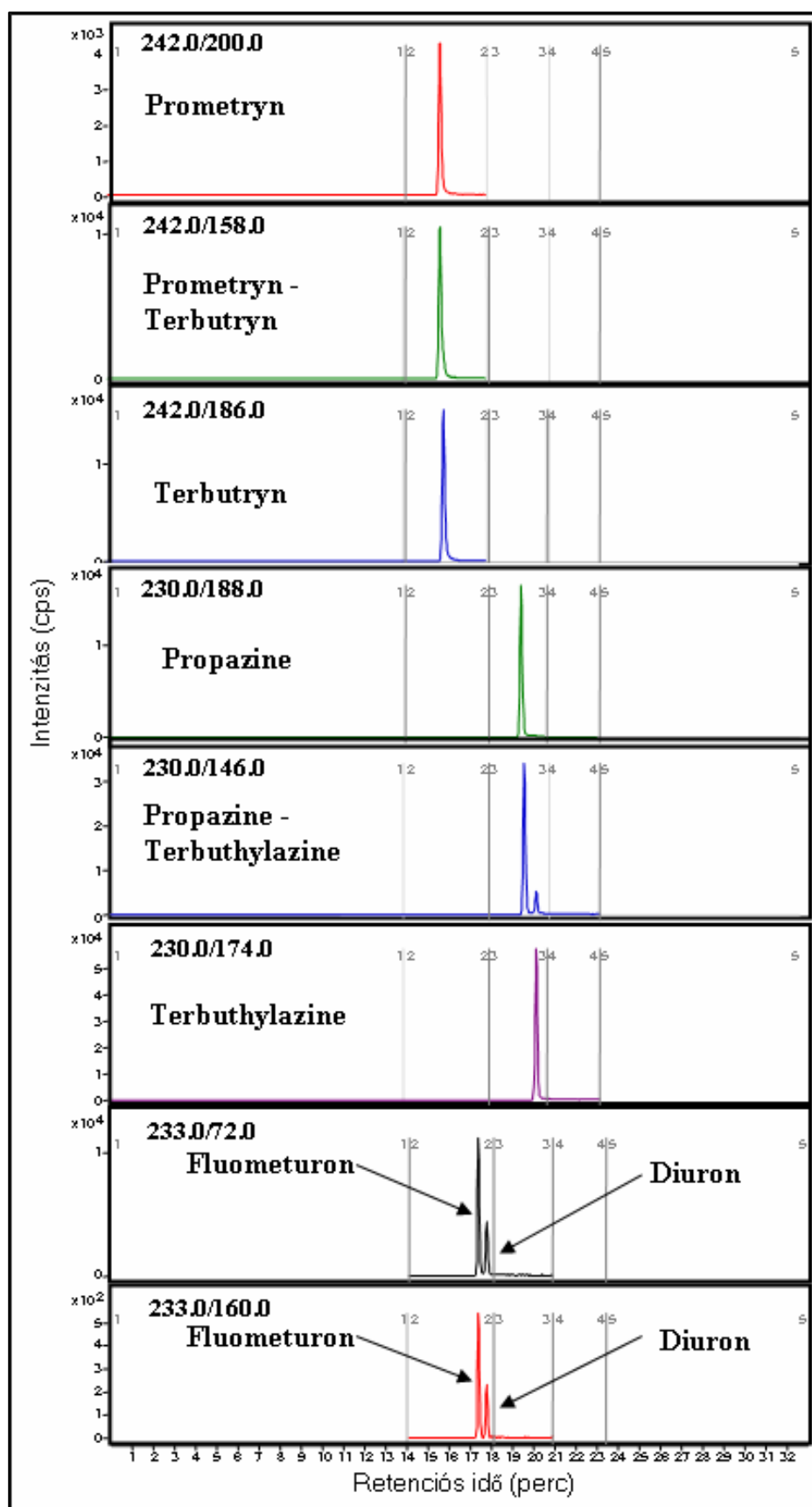
10 MELLÉKLETEK

10.1 Ábrák

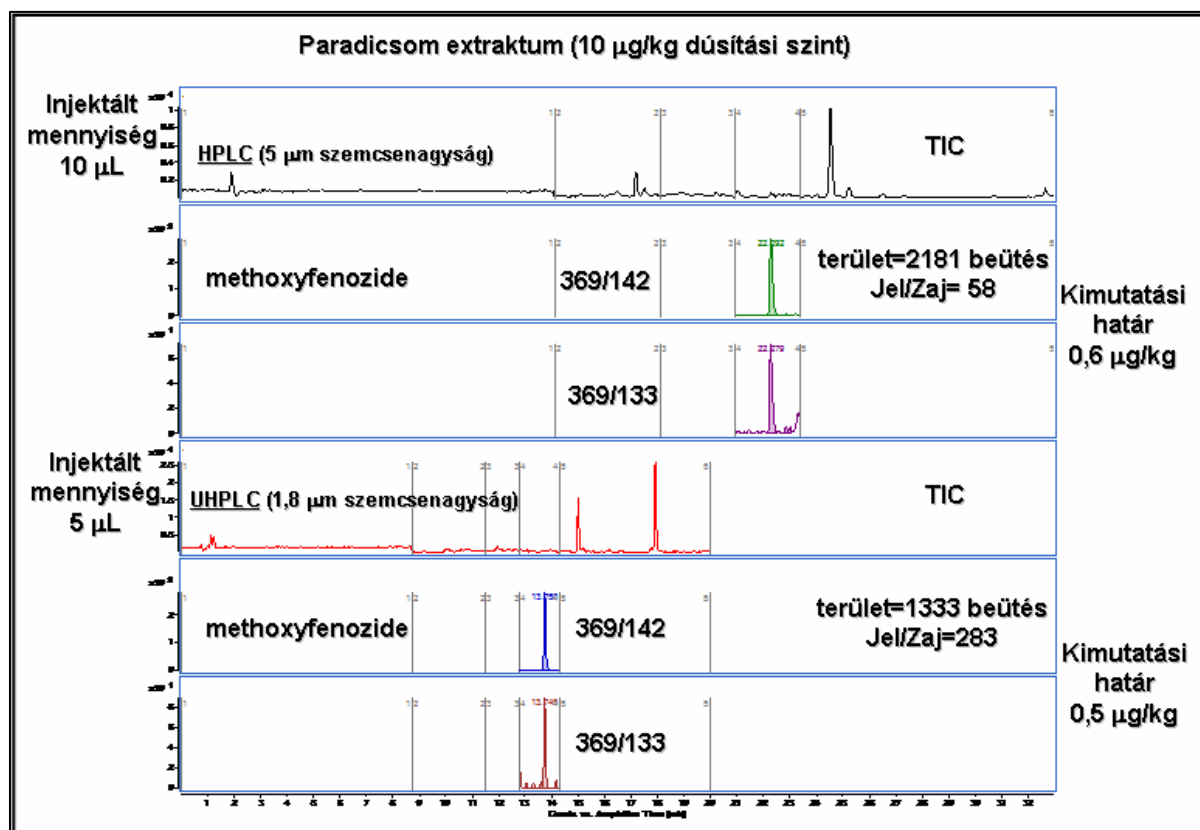


1. ábra Az alkalmazott oldószer gradiens program

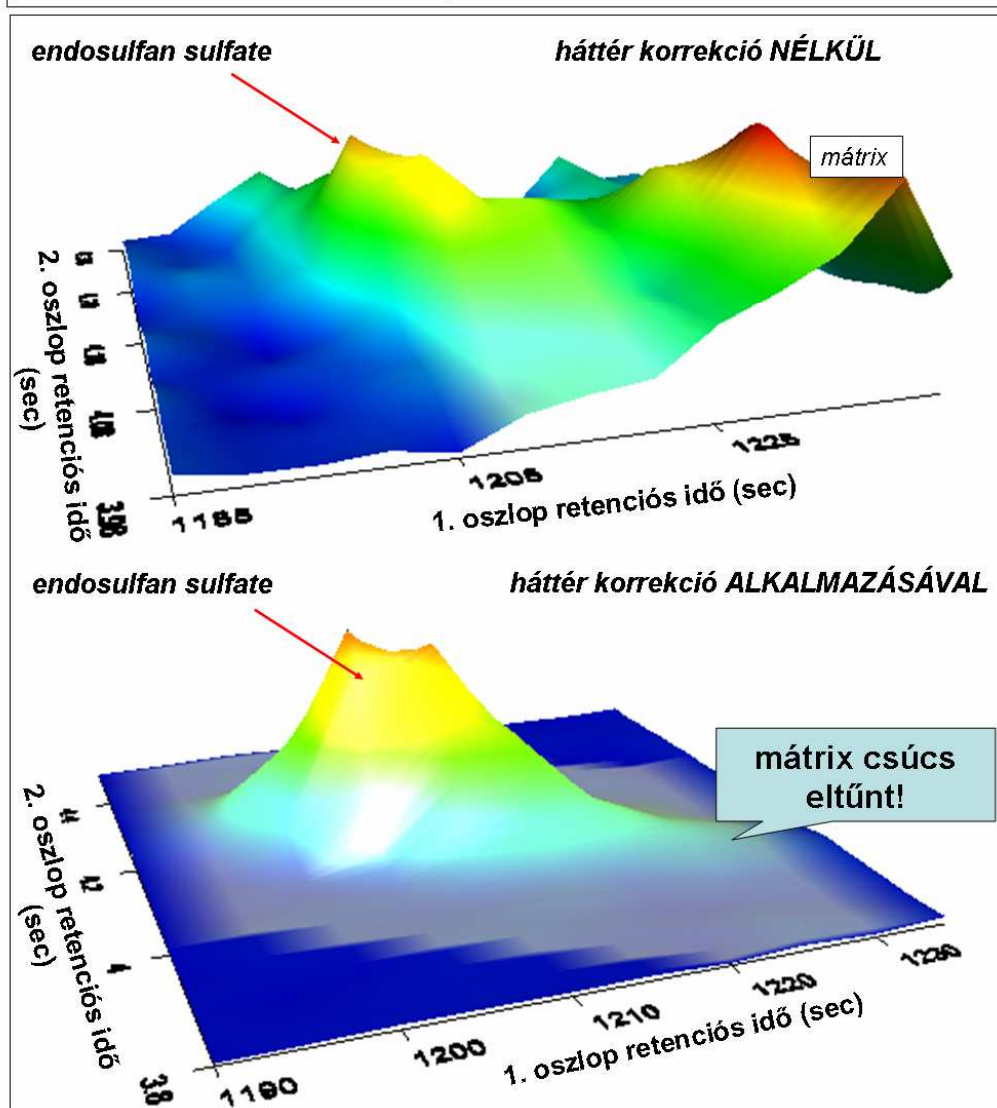
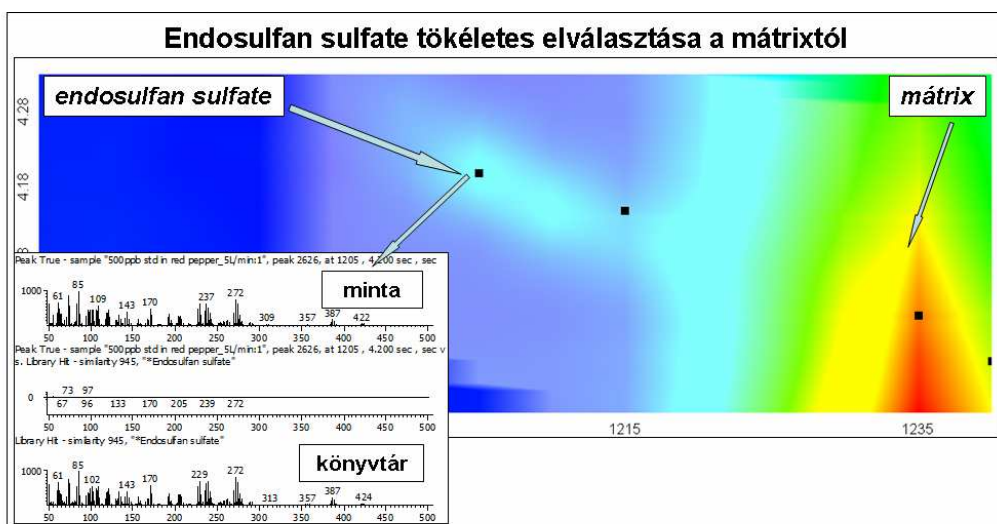
eluens A: víz+0.1 % hangyasav; eluens B: acetonitril; áramlás: 0.6 mL/perc
(állandó)



2. ábra Közös átmeneteket adó peszticidek



3. ábra Paradicsom extraktum teljes ion kromatogramja (150 peszticid), valamint a methoxyfenozide két átmenetének kromatogramja 10 µg/kg dúsítási szinten.



4. ábra Endosulfan sulfate teljes elválasztása a paprika mátrixtól

1. táblázat Detektálási és kromatográfiás paraméterek (1. csoport: beletartozik az Annex I listába; 2. csoport: EU-ban nem engedélyezett szer; 3. csoport: Európai körmérésben szereplő LC-vel mérhető peszticid; 4. csoport: a szert detektálták az EU-ban a 2000-2007 közötti időszakban)

Peszticid	Csoport	Retenciós idő (min)	Csúcsszélesség (min)	Mennyiségi átmenet (MRM1)	Minőségi átmenet (MRM2)	Fragmentor feszültség (V)	Ütközési energia1 (CE1;V)	Ütközési energia2 (CE2;V)
Acephate	3; 4	3,2	0,62	184.1 / 143.0	184.1 / 125.0	90	5	15
Acetamiprid	1; 3	11,3	0,36	223.0 / 126.0	223.0 / 56.0	120	20	15
Aclonifen	4	23,5	0,38	265.1 / 248.1	365.1 / 218.1	120	15	20
Alachlor	4	23,2	0,60	270.0 / 162.0	270.0 / 238.0	90	15	15
Alanycarb	2	22,8	0,35	400.1 / 238.1	400.1 / 150.2	90	5	20
Albendazole	4	13,6	0,41	266.0 / 234.0	266.0 / 192.0	120	20	20
Aldicarb	3	13,9	0,36	213.0 / 89.0	213.0 / 116.0	120	15	10
Aldicarb sulfone	3	5,3	0,37	223.0 / 86.0	223.0 / 148.0	120	10	5
Aldicarb sulfoxide	3	3,4	0,29	207.0 / 89.0	207.0 / 132.0	60	10	5
Anilofos	2	24,7	0,43	368.0 / 199.0	368.0 / 171.0	120	10	20
Atrazine	4	17,3	0,59	216.0 / 174.0	216.0 / 146.0	120	15	20
Azinphos-ethyl	4	23,1	0,41	368.1 / 132.2	368.1 / 160.2	150	15	10
Azoxystrobin	1; 3	21,1	0,41	404.0 / 372.0	404.0 / 344.0	120	10	20
Benalaxyl	1	24,1	0,54	326.0 / 294.0	326.0 / 208.0	120	5	15
Bendiocarb	4	16,6	0,34	224.0 / 109.0	224.0 / 167.0	90	15	5
Bromacil	4	14,2	0,36	261.0 / 205.0	261.0 / 188.0	90	10	20
Bromuconazole	4	20,5 és 21,6	0,52	378.0 / 159.0	378.0 / 70.0	120	20	20
Bupirimate	3	19,9	0,49	317.0 / 166.0	317.0 / 108.0	150	20	20
Buprofezin	3	24,9	0,54	306.0 / 201.0	306.0 / 116.0	120	10	15
Butocarboxin	4	13,0	0,41	213.0 / 75.0	213.0 / 156.0	120	15	5
Butoxycarboxin	4	4,8	0,41	223.0 / 106.0	223.0 / 166.0	90	5	5
Cambendazole	4	9,1	0,99	303.0 / 261.0	303.0 / 217.0	120	15	20
Carbaryl	3	17,2	0,39	202.0 / 145.0	202.0 / 127.0	140	10	20
Carbendazim	1; 3	3,4	0,29	192.0 / 160.0	192.0 / 132.0	150	15	20
Carbofuran	3	16,6	0,52	222.0 / 123.0	222.0 / 165.0	90	20	10
Chlorbromuron	4	21,0	0,30	293.0 / 182.0	293.0 / 204.0	120	15	20
Chlorfenvinphos	3	23,7 és 24,5	0,42	359.0 / 155.1	359.0 / 126.9	120	10	15
Chloridazon	1	10,0	0,48	222.0 / 104.0	222.0 / 92.0	120	20	20
Chlorotoluron	1	16,6	0,39	213.0 / 72.0	213.0 / 140.0	120	20	20

Peszticid	Csoport	Retenció idő (min)	Csúcsszélesség (min)	Mennyiségi átmenet (MRM1)	Minőségi átmenet (MRM2)	Fragmentor feszültség (V)	Ütközési energia1 (CE1;V)	Ütközési energia2 (CE2;V)
Chloroxuron	4	20,4	0,31	291.0 / 72.0	291.0 / 218.0	120	20	20
Chlorpropham	1; 3; 4	3,3	0,40	214.0 / 171.8	214.0 / 153.9	90	5	15
Chromafenozide	2	22,7	0,46	395.2 / 175.1	395.2 / 339.2	90	10	5
Clofentezine	3; 4	24,9	0,37	303.0 / 137.9	303.0 / 102.2	150	5	20
Cymoxanil	4	3,9	0,39	199.0 / 128.0	199.0 / 171.0	90	15	10
Cyproconazole	4	20,1	0,56	292.0 / 70.0	292.0 / 125.0	120	20	20
Cyprodinil	1; 3; 4	18,8	0,48	226.2 / 92.9	226.2 / 76.9	150	40	40
Cyromazine	4	2,3	0,26	167.0 / 85.0	167.0 / 125.0	120	20	15
Deet	2	17,6	0,91	192.1 / 119.0	192.1 / 91.1	120	15	20
Demeton-S-Metil	4	15,3	0,51	231.0 / 89.2	231.0 / 61.0	80	10	20
Desethylterbutylazine	4	15,2	0,70	202.0 / 146.0	202.0 / 110.0	120	15	20
Diafenthiuron	2	29,7	0,43	385.2 / 329.2	385.2 / 287.1	120	20	20
Diazinon	3	25,3	0,71	305.0 / 169.0	305.0 / 153.0	120	15	20
Dichlorvos	3; 4	15,5	0,36	221.1 / 109.0	221.1 / 144.9	150	15	10
Dicloran	4	19,6	0,3	207.0 / 190.1	207.0 / 160.1	150	15	20
Diethofencarb	4	20,6	0,41	268.2 / 226.2	268.2 / 180.2	90	5	15
Difenoconazole	4	23,6 dupla csúcs	0,95	406.0 / 251.0	406.0 / 337.0	120	20	15
Difenoxuron	4	17,6	0,39	287.0 / 72.0	287.0 / 123.0	90	20	20
Diflubenzuron	4	22,2	0,35	311.0 / 158.0	311.0 / 141.0	120	10	20
Dimethoate	1; 3	11,2	0,48	230.0 / 199.0	230.0 / 171.0	90	5	10
Dimethomorph	1; 3	18,8 és 19,1	0,84	388.0 / 301.0	388.0 / 165.0	150	20	20
Dimethylvinphos	2	21,1	0,36	330.9 / 205.0	330.9 / 127.1	90	20	10
Dinotefuran	2	3,8	0,36	203.1 / 129.1	203.1 / 157.1	90	5	5
Diuron	4	17,7	0,44	233.0 / 72.0	233.0 / 160.0	120	20	20
Edifenphos	2	23,3	0,38	311.0 / 173.0	311.0 / 283.1	120	5	10
Emamectin benzoate	2; 4	18,5 és 19,2	0,27	886.5 / 158.2	886.5 / 302.4	90	20	20
Ethiofencarb	4	17,8	0,60	226.0 / 107.0	226.0 / 164.0	60	15	5
Ethion	4	28,6	0,48	385.1 / 199.0	385.1 / 171.0	90	5	10
Ethiprole	2	20,1	0,54	396.9 / 351.0	396.9 / 255.1	120	15	20
Ethoxyquin	4	15,7	0,30	218.0 / 190.0	218.0 / 202.0	150	20	20
Fenamiphos	1	20,8	0,65	304.0 / 217.0	304.0 / 234.0	120	20	15
Fenarimol	1; 3; 4	20,5	0,41	331.1 / 268.2	331.1 / 259.1	150	20	20
Fenazaquin	4	27,8	0,48	307.3 / 161.3	307.3 / 147.2	150	15	15
Fenbendazole	4	16,5	0,44	300.0 / 268.0	300.0 / 159.0	120	20	20
Fenhexamid	1; 3	21,3	0,44	302.0 / 97.0	302.0 / 55.0	90	<u>25</u>	<u>30</u>
Fenobucarb	2	20,6	0,45	208.1 / 95.0	208.1 / 152.1	90	10	5

Peszticid	Csoport	Retenció idő (min)	Csúcsszélesség (min)	Mennyiségi átmenet (MRM1)	Minőségi átmenet (MRM2)	Fragmentor feszültség (V)	Ütközési energia1 (CE1;V)	Ütközési energia2 (CE2;V)
Fenoxycarb	4	22,6	0,38	302.2 / 88.2	302.2 / 116.2	90	20	5
Fenuron	4	10,0	0,63	165.0 / 72.0	165.0 / 120.0	90	20	15
Fipronil	1; 4	24,3	0,26	437.3 / 368.2	437.3 / 315.3	150	15	20
Flazasulfuron	1	19,0	0,46	408.0 / 182.0	408.0 / 301.0	120	20	10
Fluacrypyrim	2	26,6	0,51	427.1 / 145.1	427.1 / 205.1	90	20	5
Fluazifop	4	20,3	0,41	328.2 / 282.2	382.2 / 254.2	150	15	20
Flufenoxuron	4	27,5	0,45	489.0 / 158.0	489.0 / 306.0	120	15	15
Fluometuron	4	17,3	0,44	233.0 / 72.0	233.0 / 160.0	120	20	20
Fluquinconazole	4	21,5	0,41	376.1 / 307.1	376.1 / 349.2	150	20	20
Fluroxypyr	1	14,5	0,33	255.0 / 181.0	255.0 / 209.0	120	20	15
Hexaflumuron	4	25,1	0,43	461.0 / 158.0	461.0 / 141.0	120	15	15
Hexythiazox	3	28,3	0,40	353.1 / 168.2	353.1 / 228.2	120	20	10
Imazalil	1; 3	13,9	0,34	297.0 / 159.0	297.0 / 255.0	150	20	15
Imidacloprid	3	10,3	0,41	256.0 / 175.0	256.0 / 209.0	90	15	15
Indoxacarb	1; 3; 4	26,2	0,34	528.1 / 249.1	528.1 / 150.2	150	15	15
Iprodione	1; 3	22,7	0,42	330.0 / 245.0	330.0 / 101.0	90	15	20
Isocarbofos	2	20,3	0,38	312.0 / 270.0	312.0 / 236.0	90	15	15
Isofenfos Metil	2; 3	25,4	0,42	231.0 / 121.0	231.0 / 199.0	90	15	15
Isoprocab	2	18,7	0,57	194.1 / 95.1	194.1 / 152.0	90	15	5
Isoproturon	1	17,6	0,44	207.0 / 72.0	207.0 / 165.0	120	20	10
Kresoxim-methyl	1; 3; 4	24,2	0,40	336.2 / 246.2	336.2 / 229.2	150	15	20
Lenacil	4	15,1	0,54	235.0 / 153.0	235.0 / 136.0	90	10	20
Linuron	1; 3	20,6	0,43	249.0 / 160.0	249.0 / 182.0	90	20	15
Lufenuron	4	26,8	0,31	511.0 / 158.0	511.0 / 141.0	120	20	20
Malathion	3	23,0	0,55	331.0 / 99.0	331.0 / 127.0	90	20	10
Mebendazole	4	13,7	0,36	296.0 / 264.0	296.0 / 105.0	120	20	20
Metalaxyl	3	17,5	0,57	280.0 / 220.0	280.0 / 160.0	120	10	20
Metamitron	4	9,2	0,41	203.0 / 175.0	203.0 / 104.0	120	15	20
Methamidophos	1; 3; 4	3,2	0,41	142.1 / 94.1	142.1 / 125.0	90	10	10
Methidathion	3	20,7	0,43	303.0 / 85.0	303.0 / 145.0	60	15	5
Methiocarb	1; 3	20,3	0,54	226.0 / 169.0	226.0 / 121.0	90	5	20
Methiocarb sulfoxide	3	8,1	0,21	242.0 / 185.0	242.0 / 170.0	90	10	20
Methomyl	3	6,2	0,43	185.0 / 128.0	185.0 / 99.0	90	5	10
Methoxyfenozide	1; 4	22,3	0,35	369.3 / 149.2	369.3 / 133.1	90	15	20
Metobromuron	4	18,6	0,35	260.0 / 149.0	260.0 / 171.0	120	10	20
Metolachlor	4	23,0	0,60	284.0 / 252.0	284.0 / 176.0	120	10	20

Peszticid	Csoport	Retenció idő (min)	Csúcsszélesség (min)	Mennyiségi átmenet (MRM1)	Minőségi átmenet (MRM2)	Fragmentor feszültség (V)	Ütközési energia1 (CE1;V)	Ütközési energia2 (CE2;V)
Metolcarb	4	15,2	0,54	166.0 / 109.0	166.0 / 91.0	60	5	20
Miconazole	4	17,7	0,42	417.0 / 159.0	417.0 / 227.0	120	20	20
Monocrotophos	3	4,8	0,67	224.0 / 127.0	224.0 / 98.0	60	10	15
Monolinuron	4	17,9	0,47	215.0 / 126.0	215.0 / 148.0	120	15	15
Monuron	4	14,6	0,36	199.0 / 72.0	199.0 / 126.0	120	15	20
Myclobutanil	3; 4	21,2	0,60	289.2 / 70.2	289.2 / 125.1	150	15	20
Neburon	4	23,3	0,49	275.0 / 88.0	275.0 / 114.0	120	15	10
Nitempyram	2	4,6	0,29	271.0 / 225.0	271.0 / 99.0	90	10	10
Omethoate	4	3,3	0,22	214.1 / 183.0	214.1 / 125.0	90	5	20
Oxadixyl	4	14,5	1,00	279.0 / 219.0	279.0 / 133.0	90	5	20
Oxamyl	1; 3	5,1	0,51	237.0 / 72.0	237.0 / 90.0	60	10	5
Oxfendazole	4	10,3	0,41	316.0 / 191.0	316.0 / 284.0	120	20	15
Parathion-methyl	3; 4	24,7	0,45	292.0 / 236.0	292.0 / 264.0	90	10	5
Penconazole	3	22,4	0,40	284.0 / 70.0	284.0 / 159.0	90	15	20
Phosmet	1; 3; 4	21,1	0,37	318.1 / 160.2	339.0 / 253.7	90	10	5
Pirimicarb	1; 3; 4	6,6	0,58	239.2 / 72.2	239.2 / 182.1	150	20	15
Pirimiphos-methyl	1; 3; 4	25,3	0,50	306.2 / 164.2	306.2 / 108.2	150	20	20
Prochloraz	3	19,5	0,38	376.0 / 308.0	376.0 / 266.0	90	10	15
Procymidone	1; 3; 4	23,0	0,41	284.3 / 95.0	284.3 / 256.3	150	20	15
Promecarb	4	21,1	0,60	208.0 / 109.0	208.0 / 151.0	60	15	5
Prometryn	4	16,4	0,60	242.0 / 200.0	242.0 / 158.0	90	20	20
Propamocarb	1; 4	3,2	0,31	189.2 / 102.1	189.2 / 144.1	150	15	10
Propaphos	2	23,0	0,45	305.1 / 221.1	305.1 / 263.2	90	10	5
Propargite	3; 4	29,0	0,43	373.2 / 81.0	373.2 / 175.0	150	30	20
Propazine	4	19,8	0,60	230.0 / 146.0	230.0 / 188.0	120	20	20
Pyridaben	4	29,6	0,45	365.2 / 147.3	365.2 / 309.2	120	20	10
Pyridaphenthion	4	21,7	0,46	341.1 / 189.2	341.1 / 205.1	120	20	20
Pyrimethanil	1; 3	15,6	0,73	200.0 / 107.0	200.0 / 183.0	120	20	20
Pyrimidifen	2	20,7	0,46	378.1 / 184.1	378.1 / 150.2	120	20	20
Pyriproxyfen	3	27,4	0,42	322.0 / 96.0	322.0 / 185.0	120	10	20
Quinalphos	4	24,1	0,48	299.1 / 147.2	299.1 / 163.2	150	20	20
Quinoxifen	1; 3	25,9	0,51	308.1 / 196.9	308.1 / 271.9	150	35	25
Simazine	4	14,5	0,38	202.0 / 132.0	202.0 / 124.0	120	20	20
Spinosyn A	1; 3	17,5	0,39	732.5 / 142.0	732.5 / 98.0	150	20	20
Spinosyn D	1; 3	18,3	0,44	746.5 / 142.0	nincs 2. átmenet	120	20	nincs 2. átmenet

Peszticid	Csoport	Retenció idő (min)	Csúcsszélesség (min)	Mennyiségi átmenet (MRM1)	Minőségi átmenet (MRM2)	Fragmentor feszültség (V)	Ütközési energia1 (CE1;V)	Ütközési energia2 (CE2;V)
Spiromesifen	4	30,4	0,81	371.0 / 273.0	371.0 / 255.0	60	5	20
Spiroxamine	1; 3	16,2	0,52	298.0 / 144.0	298.0 / 100.0	120	20	20
Tebuconazole	3	21,7	0,46	308.0 / 70.0	308.0 / 125.0	90	20	20
Tebufenozide	4	23,7	0,42	353.2 / 133.1	353.2 / 296.9	150	15	5
Tebufenpyrad	4	26,3	0,45	334.1 / 145.1	334.1 / 171.1	150	20	20
Teflubenzuron	4	25,4	0,40	381.0 / 158.0	381.0 / 141.0	90	20	20
Terbuthylazine	4	20,3	0,60	230.0 / 174.0	230.0 / 146.0	120	15	20
Terbutrin	4	16,5	0,63	242.0 / 186.0	242.0 / 158.0	120 (90)	20	20
Thiabendazole	1; 3	3,6	0,22	202.0 / 175.0	202.0 / 131.0	90	5	10
Thiacloprid	1	13,3	0,36	253.0 / 126.0	253.0 / 186.0	120	20	10
Thiametoxam	1	7,5	0,51	292.0 / 211.0	292.0 / 181.0	90	10	20
Thiocyclam	2	2,9	0,24	182.0 / 137.0	182.0 / 73.0	90	15	20
Thiophanate-ethyl	4	18,9	0,41	371.1 / 151.1	371.1 / 325.1	90	20	10
Tolfenpyrad	2	26,1	0,48	384.1 / 197.1	384.1 / 171.1	120	20	20
TPP	kísérő sztenderd	24,6	0,37	327.0 / 77.2	327.0 / 152.2	120	35	30
Triadimefon	3; 4	21,6	0,49	294.2 / 197.1	294.2 / 225.0	150	10	10
Triadimenol	3; 4	19,5 és 19,9	0,45	296.2 / 70.2	296.2 / 227.0	60	10	5
Triazophos	3	22,8	0,41	314.1 / 162.2	314.1 / 286.2	150	20	10
Triclocarban	4	24,8	0,48	315.0 / 128.0	315.0 / 162.0	120	15	20
Trifloxystrobin	1; 3; 4	26,4	0,43	409.2 / 186.2	409.2 / 206.2	120	20	10
Triflumizol	4	22,9	0,54	346.0 / 278.0	346.0 / 73.0	90	5	10
Triflumuron	4	24,1	0,37	359.0 / 156.0	359.0 / 139.0	120	15	20
XMC	2	16,4 és 16,9 és 17,5	1,12	180.1 / 123.0	180.1 / 95.1	60	5	20

2. táblázat Linearitás és mátrixhatás adatai

Peszticid	oldószer		paradicsom mátrix		körte mátrix		narancs mátrix		$m_{\text{mátrix}} / m_{\text{oldószer}}$			mátrixhatás (%) = $(1 - (m_{\text{mátrix}} / m_{\text{oldószer}})) * 100$		
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²	paradicsom	körte	narancs	paradicsom	körte	narancs
Acephate	79,6	0,983	37,1	0,890	92,7	0,981	67,5	0,992	0,466	1,164	0,848	-53,4	16,4	-15,2
Acetamiprid	144,2	0,998	126,1	0,998	140,0	0,998	153,1	1,000	0,875	0,971	1,062	-12,5	-2,9	6,2
Aclonifen	40,0	0,999	33,3	1,000	23,0	0,987	26,0	0,994	0,831	0,575	0,649	-16,9	-42,5	-35,1
Alachlor	46,6	0,997	46,0	1,000	40,9	0,999	39,1	0,995	0,988	0,877	0,840	-1,2	-12,3	-16,0
Albendazole	748,7	0,998	645,2	0,999	677,9	0,998	721,6	0,992	0,862	0,905	0,964	-13,8	-9,5	-3,6
Aldicarb	34,0	0,975	25,0	0,986	31,3	0,995	30,5	0,990	0,734	0,920	0,895	-26,6	-8,0	-10,5
Aldicarb sulfone	23,9	0,988	23,8	0,988	25,8	0,972	31,4	0,985	0,998	1,083	1,317	-0,2	8,3	31,7
Aldicarb sulfoxide	32,8	0,997	29,2	0,997	38,0	0,985	41,6	0,994	0,891	1,157	1,269	-10,9	15,7	26,9
Anilofos	230,7	0,999	221,0	1,000	161,5	0,993	180,7	0,988	0,958	0,700	0,783	-4,2	-30,0	-21,7
Atrazine	633,9	0,999	606,0	0,999	739,4	1,000	709,7	0,998	0,956	1,166	1,120	-4,4	16,6	12,0
Azinphos-ethyl	116,5	0,940	84,5	0,973	78,4	0,953	75,7	0,989	0,725	0,673	0,650	-27,5	-32,7	-35,0
Azoxystrobin	725,5	0,999	680,6	0,997	724,9	0,999	746,0	1,000	0,938	0,999	1,028	-6,2	-0,1	2,8
Benalaxyl	259,2	0,999	259,9	0,999	216,7	0,998	223,7	0,991	1,003	0,836	0,863	0,3	-16,4	-13,7
Bendiocarb	206,4	0,978	216,7	0,988	250,7	0,985	138,0	0,952	1,050	1,214	0,669	5,0	21,4	-33,1
Bromacil	49,5	0,993	40,6	0,992	50,4	0,994	52,6	0,999	0,821	1,017	1,062	-17,9	1,7	6,2
Bromuconazole	147,0	1,000	129,5	1,000	107,4	0,995	122,8	0,994	0,881	0,730	0,835	-11,9	-27,0	-16,5
Bupirimate	414,7	1,000	383,0	1,000	353,0	0,997	378,0	0,976	0,924	0,851	0,912	-7,6	-14,9	-8,8
Buprofezin	708,6	0,998	628,2	0,999	369,1	0,952	357,0	1,000	0,887	0,521	0,504	-11,3	-47,9	-49,6
Butocarboxin	74,2	0,977	61,1	0,992	71,7	0,997	41,5	0,995	0,824	0,967	0,559	-17,6	-3,3	-44,1
Butoxycarboxin	9,3	0,998	8,1	0,998	9,7	0,996	9,8	0,988	0,870	1,039	1,053	-13,0	3,9	5,3
Cambendazole	334,3	0,999	279,5	0,999	320,2	1,000	357,7	0,998	0,836	0,958	1,070	-16,4	-4,2	7,0
Carbaryl	22,0	0,999	26,6	1,000	10,0	0,980	8,7	0,998	1,212	0,455	0,395	21,2	-54,5	-60,5
Carbendazim	476,4	0,994	381,8	0,998	487,9	0,992	514,3	0,994	0,801	1,024	1,079	-19,9	2,4	7,9
Carbofuran	393,5	0,981	422,5	0,999	412,5	0,999	182,3	0,989	1,074	1,048	0,463	7,4	4,8	-53,7
Chlorbromuron	21,1	0,993	16,6	0,995	18,3	0,989	20,1	0,996	0,787	0,869	0,952	-21,3	-13,1	-4,8
Chlorfenvinphos	103,1	0,996	93,1	0,998	76,6	0,994	86,1	0,996	0,903	0,743	0,835	-9,7	-25,7	-16,5
Chloridazon	32,4	0,982	27,4	0,989	29,4	0,995	31,1	0,995	0,845	0,907	0,960	-15,5	-9,3	-4,0
Chlorotoluron	248,9	0,990	215,9	0,997	251,5	0,999	143,9	0,982	0,867	1,010	0,578	-13,3	1,0	-42,2
Chloroxuron	241,2	0,998	230,8	0,999	217,5	0,997	228,1	0,996	0,957	0,901	0,945	-4,3	-9,9	-5,5
Chromafenozide	753,6	0,999	696,0	0,999	614,4	0,998	690,6	0,997	0,923	0,815	0,916	-7,7	-18,5	-8,4
Clofentezine	24,3	0,999	20,3	0,994	12,7	0,981	13,0	0,989	0,835	0,522	0,533	-16,5	-47,8	-46,7
Cyproconazole	573,6	1,000	547,3	0,999	656,0	1,000	690,8	0,997	0,954	1,144	1,204	-4,6	14,4	20,4
Cyprodinil	282,0	0,999	260,5	1,000	183,1	0,979	179,7	0,980	0,924	0,649	0,637	-7,6	-35,1	-36,3

Peszticid	oldószer		paradicsom		körte mátrix		narancs mátrix		m _{mátrix} / m _{oldószer}			mátrixhatás (%) = (1-(m _{mátrix} / m _{oldószer}))*100		
	m		mátrix		m		m		paradicsom	körte	narancs	paradicsom	körte	narancs
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²	paradicsom	körte	narancs	paradicsom	körte	narancs
Cyromazine	79,2	0,994	30,6	0,997	78,5	0,908	34,9	0,944	0,386	0,990	0,441	-61,4	-1,0	-55,9
Deet	1166,1	0,998	1115,6	0,998	1386,4	0,999	1124,9	0,996	0,957	1,189	0,965	-4,3	18,9	-3,5
Demeton-S-Metil	151,1	0,998	133,2	0,992	137,4	0,998	158,4	0,998	0,882	0,909	1,049	-11,8	-9,1	4,9
Desethylterbutylazine	726,1	1,000	632,4	0,999	694,5	0,999	777,0	0,999	0,871	0,956	1,070	-12,9	-4,4	7,0
Diazinon	2640,6	0,999	2407,3	0,998	2395,0	0,999	2588,1	0,984	0,912	0,907	0,980	-8,8	-9,3	-2,0
Dichlorvos	115,7	0,993	99,4	0,990	108,2	0,997	114,7	0,994	0,860	0,936	0,992	-14,0	-6,4	-0,8
Dicloran	6,5	0,995	5,7	0,999	6,1	0,990	5,9	0,994	0,877	0,944	0,905	-12,3	-5,6	-9,5
Diethofencarb	324,6	0,999	309,3	0,999	301,0	0,999	300,0	0,999	0,953	0,927	0,924	-4,7	-7,3	-7,6
Difenoconazole	806,6	0,999	674,7	1,000	523,3	0,934	687,1	0,988	0,836	0,649	0,852	-16,4	-35,1	-14,8
Difenofoxuron	180,5	0,998	169,3	0,995	192,1	0,997	173,6	0,996	0,938	1,064	0,961	-6,2	6,4	-3,9
Diflubenzuron	63,2	1,000	53,2	1,000	44,2	0,998	45,8	0,989	0,842	0,700	0,725	-15,8	-30,0	-27,5
Dimethoate	69,8	0,989	60,4	0,997	72,9	0,999	77,5	0,999	0,866	1,045	1,110	-13,4	4,5	11,0
Dimethomorph	163,8	1,000	142,9	0,998	159,5	0,999	184,6	1,000	0,872	0,974	1,127	-12,8	-2,6	12,7
Dimethylvinphos	233,0	0,998	189,9	0,996	200,0	0,998	210,7	0,999	0,815	0,858	0,904	-18,5	-14,2	-9,6
Diuron	276,0	0,997	254,2	0,996	308,0	0,999	307,6	0,999	0,921	1,116	1,115	-7,9	11,6	11,5
Edifenphos	237,6	0,999	215,8	1,000	164,7	0,999	194,7	0,987	0,908	0,693	0,819	-9,2	-30,7	-18,1
Eamectin benzoate	167,6	0,999	130,5	0,999	85,1	0,990	58,3	0,995	0,779	0,508	0,348	-22,1	-49,2	-65,2
Ethiofencarb	405,0	0,998	355,5	0,998	312,7	0,986	176,4	0,996	0,878	0,772	0,435	-12,2	-22,8	-56,5
Ethion	87,4	0,998	45,8	0,981	18,7	0,917	12,2	0,998	0,524	0,214	0,139	-47,6	-78,6	-86,1
Ethiprole	138,8	1,000	138,5	1,000	142,1	1,000	136,7	1,000	0,997	1,023	0,985	-0,3	2,3	-1,5
Ethoxyquin	3,0	0,981	2,9	0,938	2,3	0,961	3,5	0,977	0,967	0,765	1,170	-3,3	-23,5	17,0
Fenamiphos	384,7	1,000	340,3	0,999	325,5	1,000	385,1	0,999	0,885	0,846	1,001	-11,5	-15,4	0,1
Fenarimol	109,6	1,000	94,1	1,000	103,8	0,997	121,1	0,994	0,859	0,947	1,105	-14,1	-5,3	10,5
Fenazaquin	389,7	0,999	229,7	0,981	137,7	0,964	82,8	0,999	0,589	0,353	0,212	-41,1	-64,7	-78,8
Fenbendazole	1101,7	0,999	907,5	0,999	746,4	0,992	914,7	0,989	0,824	0,677	0,830	-17,6	-32,3	-17,0
Fenhexamid	92,1	0,999	81,1	0,999	72,1	0,994	78,8	0,996	0,881	0,783	0,856	-11,9	-21,7	-14,4
Fenobucarb	444,9	0,996	417,5	0,996	470,0	0,998	464,9	1,000	0,938	1,056	1,045	-6,2	5,6	4,5
Fenoxycarb	176,6	0,998	155,5	0,999	123,3	0,992	146,7	0,989	0,881	0,698	0,830	-11,9	-30,2	-17,0
Fenuron	292,5	0,997	236,4	0,998	305,3	0,999	305,2	0,999	0,808	1,044	1,043	-19,2	4,4	4,3
Fipronil	15,1	0,987	4,2	0,987	2,2	0,928	9,5	0,997	0,281	0,147	0,631	-71,9	-85,3	-36,9
Flazasulfuron	306,9	1,000	223,0	0,992	244,2	0,993	279,2	0,999	0,727	0,796	0,910	-27,3	-20,4	-9,0
Fluacrypyrim	1067,6	0,997	972,8	0,999	667,2	0,990	739,5	0,986	0,911	0,625	0,693	-8,9	-37,5	-30,7
Fluazifop	243,6	1,000	230,8	0,999	269,2	0,999	282,9	1,000	0,948	1,105	1,161	-5,2	10,5	16,1
Flufenoxuron	156,3	0,979	43,5	0,713	17,8	0,750	10,6	0,859	0,278	0,114	0,068	-72,2	-88,6	-93,2
Fluometuron	352,1	0,997	344,6	0,996	402,5	0,999	384,7	0,999	0,979	1,143	1,093	-2,1	14,3	9,3
Fluquinconazole	93,3	1,000	85,6	1,000	91,2	0,999	97,2	0,989	0,917	0,978	1,042	-8,3	-2,2	4,2

Peszticid	oldószer		paradicsom		körte		narancs		m _{mátrix} / m _{oldószer}			mátrixhatás (%) = (1-(m _{mátrix} / m _{oldószer}))*100		
	mátrix		mátrix		mátrix		mátrix		paradicsom körte narancs			paradicsom körte narancs		
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²	paradicsom	körte	narancs	paradicsom	körte	narancs
Fluroxypyr	14,3	0,999	12,2	0,994	15,2	0,998	14,4	0,990	0,851	1,064	1,006	-14,9	6,4	0,6
Hexaflumuron	85,8	0,991	46,4	0,960	21,8	0,943	16,8	0,998	0,541	0,254	0,196	-45,9	-74,6	-80,4
Hexythiazox	99,3	0,999	60,2	0,979	30,6	0,964	22,5	0,998	0,607	0,308	0,226	-39,3	-69,2	-77,4
Imazalil	123,7	0,997	100,0	0,998	99,4	0,995	114,5	0,988	0,809	0,804	0,926	-19,1	-19,6	-7,4
Imidacloprid	36,7	0,994	33,5	0,998	41,3	0,995	42,9	0,999	0,913	1,125	1,170	-8,7	12,5	17,0
Indoxacarb	53,2	0,999	43,8	0,998	19,7	0,979	20,7	0,997	0,822	0,371	0,390	-17,8	-62,9	-61,0
Iprodione	37,3	0,988	37,0	0,998	34,6	0,981	35,8	0,990	0,993	0,928	0,960	-0,7	-7,2	-4,0
Isocarbofos	1,8	0,915	1,2	0,898	1,7	0,934	2,2	0,978	0,642	0,927	1,214	-35,8	-7,3	21,4
Isofenfos Metil	266,1	0,999	241,6	0,999	177,5	0,995	205,3	0,991	0,908	0,667	0,771	-9,2	-33,3	-22,9
Isoprocarb	338,3	0,996	332,9	0,998	346,6	0,998	308,2	0,999	0,984	1,025	0,911	-1,6	2,5	-8,9
Isoproturon	384,4	0,997	371,3	0,996	432,5	0,998	301,5	0,991	0,966	1,125	0,784	-3,4	12,5	-21,6
Kresoxim-methyl	16,3	0,932	13,9	0,961	18,4	0,948	17,2	0,988	0,855	1,131	1,054	-14,5	13,1	5,4
Lenacil	254,4	0,999	230,2	0,998	255,0	1,000	267,6	0,998	0,905	1,003	1,052	-9,5	0,3	5,2
Linuron	54,5	0,996	44,8	0,997	53,3	0,998	47,9	0,998	0,822	0,978	0,879	-17,8	-2,2	-12,1
Lufenuron	74,6	0,983	25,6	0,771	10,5	0,830	7,1	0,909	0,344	0,141	0,095	-65,6	-85,9	-90,5
Malathion	227,7	0,999	221,5	1,000	210,0	0,999	209,5	0,995	0,973	0,922	0,920	-2,7	-7,8	-8,0
Mebendazole	657,9	1,000	566,3	0,999	663,0	0,997	713,0	0,997	0,861	1,008	1,084	-13,9	0,8	8,4
Metalaxyl	256,1	0,998	256,0	0,999	254,2	0,997	248,0	0,999	1,000	0,992	0,968	0,0	-0,8	-3,2
Metamitron	120,4	0,998	103,8	0,999	128,3	1,000	128,0	0,999	0,862	1,066	1,063	-13,8	6,6	6,3
Methamidophos	49,3	0,983	30,7	0,955	49,5	0,989	46,2	0,999	0,622	1,003	0,936	-37,8	0,3	-6,4
Methidathion	83,5	0,998	74,0	0,988	64,6	0,999	60,5	0,999	0,885	0,774	0,724	-11,5	-22,6	-27,6
Methiocarb	214,5	0,997	205,1	0,999	207,1	0,998	207,7	0,998	0,956	0,965	0,968	-4,4	-3,5	-3,2
Methiocarb sulfoxide	106,5	0,965	89,5	0,954	97,4	0,957	74,6	0,952	0,841	0,914	0,701	-15,9	-8,6	-29,9
Methomyl	22,4	0,913	19,2	0,964	21,0	0,922	22,1	0,984	0,859	0,939	0,986	-14,1	-6,1	-1,4
Methoxyfenozide	788,5	0,999	770,4	0,999	737,8	0,999	764,1	0,998	0,977	0,936	0,969	-2,3	-6,4	-3,1
Metobromuron	4,3	0,993	3,2	0,979	3,4	0,997	4,3	0,978	0,732	0,793	0,985	-26,8	-20,7	-1,5
Metolachlor	610,1	0,999	612,2	0,999	559,3	1,000	565,5	0,997	1,003	0,917	0,927	0,3	-8,3	-7,3
Metolcarb	166,9	0,997	131,4	0,984	179,8	0,999	196,1	0,999	0,787	1,077	1,175	-21,3	7,7	17,5
Miconazole	177,2	0,995	76,0	0,916	48,8	0,915	53,9	0,998	0,429	0,275	0,304	-57,1	-72,5	-69,6
Monocrotophos	64,6	0,997	53,5	0,997	71,3	0,995	80,5	0,997	0,829	1,104	1,245	-17,1	10,4	24,5
Monolinuron	54,5	0,996	43,6	0,992	75,2	0,964	36,7	0,975	0,800	1,381	0,674	-20,0	38,1	-32,6
Monuron	134,9	0,994	131,1	0,997	157,7	0,999	147,1	0,993	0,972	1,169	1,090	-2,8	16,9	9,0
Myclobutanil	465,5	1,000	433,7	1,000	537,4	1,000	547,1	0,996	0,932	1,154	1,175	-6,8	15,4	17,5
Neburon	109,7	0,997	102,5	0,999	90,2	0,995	101,0	0,991	0,935	0,822	0,921	-6,5	-17,8	-7,9
Nitempyram	42,1	0,998	37,0	0,997	46,6	0,995	50,4	0,995	0,878	1,108	1,196	-12,2	10,8	19,6
Omethoate	49,1	0,992	29,1	0,996	51,6	0,984	53,3	0,997	0,591	1,051	1,084	-40,9	5,1	8,4

Peszticid	oldószer		paradicsom mátrix		körte mátrix		narancs mátrix		m _{mátrix} / m _{oldószer}			mátrixhatás (%) = (1-(m _{mátrix} / m _{oldószer}))*100		
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²	paradicsom	körte	narancs	paradicsom	körte	narancs
Oxadixyl	105,2	0,999	102,2	0,999	123,3	1,000	127,9	0,999	0,971	1,172	1,215	-2,9	17,2	21,5
Oxamyl	93,8	0,986	91,2	0,981	93,9	0,956	109,7	0,962	0,973	1,002	1,170	-2,7	0,2	17,0
Oxfendazole	134,5	0,999	123,2	0,999	160,1	1,000	162,1	0,999	0,916	1,190	1,205	-8,4	19,0	20,5
Parathion-ethyl	85,4	0,996	72,7	1,000	60,7	0,993	71,6	0,988	0,852	0,711	0,839	-14,8	-28,9	-16,1
Penconazole	526,8	1,000	502,1	0,999	516,3	0,999	570,7	0,990	0,953	0,980	1,083	-4,7	-2,0	8,3
Pirimicarb	464,4	0,999	376,1	0,999	457,4	0,998	533,4	0,999	0,810	0,985	1,149	-19,0	-1,5	14,9
Pirimiphos-methyl	986,7	0,998	841,1	0,999	658,6	0,990	764,8	0,991	0,852	0,667	0,775	-14,8	-33,3	-22,5
Prochloraz	236,6	0,999	206,9	1,000	169,3	0,993	208,8	0,984	0,874	0,716	0,883	-12,6	-28,4	-11,7
Procymidone	14,4	0,997	12,7	0,997	12,2	0,997	13,5	0,998	0,886	0,846	0,942	-11,4	-15,4	-5,8
Promecarb	368,4	0,996	312,4	0,993	342,2	0,996	352,8	0,999	0,848	0,929	0,958	-15,2	-7,1	-4,2
Prometryn	320,9	1,000	308,0	0,999	312,1	0,999	329,1	0,989	0,960	0,973	1,026	-4,0	-2,7	2,6
Propamocarb	264,3	0,995	176,8	0,979	288,9	0,993	275,2	0,947	0,669	1,093	1,041	-33,1	9,3	4,1
Propargite	16,0	0,989	7,0	0,947	3,6	0,773	1,6	0,981	0,440	0,226	0,099	-56,0	-77,4	-90,1
Propazine	485,3	1,000	441,4	1,000	507,0	1,000	486,8	0,988	0,909	1,045	1,003	-9,1	4,5	0,3
Pyridaben	528,4	0,990	230,9	0,857	90,8	0,773	43,9	0,962	0,437	0,172	0,083	-56,3	-82,8	-91,7
Pyridaphenthion	373,9	1,000	345,2	0,999	330,5	1,000	353,8	0,997	0,923	0,884	0,946	-7,7	-11,6	-5,4
Pyrimethanil	149,8	0,998	122,7	0,998	140,3	0,999	144,9	0,986	0,819	0,937	0,967	-18,1	-6,3	-3,3
Pyriproxyfen	2094,4	0,999	1339,6	0,974	819,1	0,952	522,4	0,998	0,640	0,391	0,249	-36,0	-60,9	-75,1
Quinalphos	201,2	0,999	181,4	1,000	163,4	0,995	184,9	0,985	0,901	0,812	0,919	-9,9	-18,8	-8,1
Quinoxifen	534,6	1,000	352,2	0,986	224,5	0,964	168,7	0,996	0,659	0,420	0,316	-34,1	-58,0	-68,4
Simazine	210,0	1,000	198,2	0,999	236,7	1,000	224,7	0,999	0,944	1,127	1,070	-5,6	12,7	7,0
Spinosyn A	657,2	0,998	561,7	0,999	507,3	0,996	527,8	0,994	0,855	0,772	0,803	-14,5	-22,8	-19,7
Spinosyn D	117,8	0,997	86,5	0,994	61,8	0,978	80,0	0,996	0,734	0,525	0,679	-26,6	-47,5	-32,1
Spiroxamine	1078,3	1,000	1021,5	1,000	1085,3	0,998	1215,2	0,998	0,947	1,006	1,127	-5,3	0,6	12,7
Tebuconazole	636,4	1,000	603,7	0,999	679,9	0,999	709,1	0,992	0,949	1,068	1,114	-5,1	6,8	11,4
Tebufenozide	36,1	0,998	36,7	0,998	29,0	0,993	30,7	0,994	1,017	0,805	0,850	1,7	-19,5	-15,0
Tebuftenpyrad	122,4	1,000	92,7	1,000	59,6	0,986	62,0	0,993	0,758	0,487	0,506	-24,2	-51,3	-49,4
Teflubenzuron	37,2	0,996	25,2	0,987	13,0	0,964	12,8	0,999	0,676	0,350	0,344	-32,4	-65,0	-65,6
Terbutylazine	1652,9	0,999	1559,6	0,999	1704,8	1,000	1660,0	0,989	0,944	1,031	1,004	-5,6	3,1	0,4
Terbutrin	1193,0	1,000	1128,6	0,999	1093,8	0,998	1138,1	0,985	0,946	0,917	0,954	-5,4	-8,3	-4,6
Thiabendazole	4,2	0,977	3,6	0,986	4,9	0,996	4,7	0,990	0,848	1,169	1,118	-15,2	16,9	11,8
Thiacloprid	167,0	0,994	146,5	0,997	140,6	0,989	157,3	0,999	0,877	0,842	0,942	-12,3	-15,8	-5,8
Thiametoxam	32,4	0,996	29,8	0,987	31,0	0,995	36,3	0,989	0,919	0,957	1,121	-8,1	-4,3	12,1
Thiocyclam	224,8	0,995	174,3	0,990	264,5	0,999	330,0	1,000	0,775	1,177	1,468	-22,5	17,7	46,8
Thiophanate-ethyl	318,2	0,999	293,3	0,999	205,5	0,997	100,6	0,960	0,922	0,646	0,316	-7,8	-35,4	-68,4
Tolfenpyrad	179,2	0,999	118,6	0,992	68,7	0,961	57,6	0,999	0,662	0,383	0,321	-33,8	-61,7	-67,9

Peszticid	oldószer		paradicsom mátrix		körte mátrix		narancs mátrix		$m_{\text{mátrix}} / m_{\text{oldószer}}$			mátrixhatás (%) = $(1 - (m_{\text{mátrix}} / m_{\text{oldószer}})) * 100$		
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²	paradicsom	körte	narancs	paradicsom	körte	narancs
TPP	249,2	0,998	190,7	0,995	152,0	0,994	169,0	0,998	0,765	0,610	0,678	-23,5	-39,0	-32,2
Triadimefon	206,3	1,000	192,0	0,998	229,5	1,000	238,0	0,996	0,931	1,113	1,154	-6,9	11,3	15,4
Triadimenol	364,9	1,000	352,2	0,998	438,4	1,000	432,5	0,997	0,965	1,202	1,185	-3,5	20,2	18,5
Triazophos	382,4	1,000	401,8	1,000	364,8	0,999	370,8	0,990	1,051	0,954	0,970	5,1	-4,6	-3,0
Triclocarban	33,7	0,998	16,3	0,935	9,6	0,916	6,0	0,991	0,484	0,284	0,177	-51,6	-71,6	-82,3
Trifloxystrobin	437,1	0,999	391,0	0,996	211,0	0,985	215,8	0,991	0,895	0,483	0,494	-10,5	-51,7	-50,6
Triflumizol	529,9	0,999	404,1	0,999	308,6	0,993	398,7	0,989	0,763	0,582	0,752	-23,7	-41,8	-24,8
Triflumuron	122,1	0,996	99,0	0,997	61,4	0,977	69,9	0,997	0,810	0,502	0,572	-19,0	-49,8	-42,8
XMC	89,5	0,937	77,2	0,995	95,3	0,962	61,0	0,793	0,863	1,064	0,682	-13,7	6,4	-31,8

3. táblázat Kinyerési hatásfok értékek 100 µg/kg dúsítási szinten (6 párhuzamos extrakció eredményei)

Peszticid	Paradicsom		Körte		Narancs	
	Átlag	RSD(%)	Átlag	RSD(%)	Átlag	RSD(%)
Acephate	98,3	6,1	118,9	2,6	88,7	4,8
Acetamiprid	100,0	2,8	93,6	3,7	99,8	1,6
Aclonifen	96,7	10,2	82,1	8,9	81,2	13,8
Alachlor	94,2	2,1	89,8	5,2	74,8	2,5
Albendazole	80,9	8,2	73,8	1,9	90,4	2,3
Aldicarb	96,2	4,3	91,2	5,9	93,0	3,2
Aldicarb sulfone	98,9	9,0	107,2	5,7	106,0	6,5
Aldicarb sulfoxide	100,0	4,2	112,5	3,4	87,9	6,6
Anilofos	99,1	9,6	74,4	6,2	88,0	7,6
Atrazine	96,0	8,3	89,6	4,0	88,7	1,5
Azinphos-ethyl	88,4	9,4	90,6	5,3	105,0	7,3
Azoxystrobin	100,2	6,3	90,2	3,7	88,7	1,4
Benalaxyl	100,3	8,9	85,7	5,1	78,0	3,1
Bendiocarb	70,3	23,4	80,9	14,1	85,1	12,0
Bromacil	89,3	4,5	92,6	4,8	101,7	5,8
Bromuconazole	93,9	8,4	92,3	4,0	99,7	2,9
Bupirimate	99,2	7,4	77,6	4,3	94,4	1,6
Buprofezin	96,5	17,2	79,5	3,1	82,1	5,6
Butocarboxin	98,7	2,0	80,6	4,1	78,8	12,8
Butoxycarboxin	101,1	7,8	97,5	13,4	94,0	10,9
Cambendazole	95,8	7,0	76,5	5,3	97,5	2,5
Carbaryl	96,0	20,7	118,9	16,9	117,8	12,0
Carbendazim	95,0	1,8	88,9	6,7	96,5	1,0
Carbofuran	104,6	4,4	99,6	3,4	92,6	6,2
Chlorbromuron	87,3	15,5	93,6	16,5	97,6	2,7
Chlorfenvinphos	102,8	11,7	79,0	4,4	86,2	6,0
Chloridazon	97,4	3,4	95,6	3,1	93,6	3,4
Chlorotoluron	97,4	4,4	88,3	7,2	94,4	7,4
Chloroxuron	91,4	7,5	82,7	3,1	90,6	2,6
Chromafenozide	84,6	2,2	77,8	1,0	77,5	4,4
Clofentezine	104,5	8,5	77,3	7,0	90,0	16,2
Cyproconazole	99,7	6,0	85,1	3,7	94,0	1,2
Cyprodinil	99,9	8,9	80,3	3,3	83,2	9,6
Cyromazine	59,1	6,7	48,8	8,2	54,2	8,7
Deet	87,3	6,2	88,1	2,7	91,3	2,3
Demeton-S-Metil	85,9	6,4	80,3	4,6	82,6	1,9
Desethylterbutylazine	89,8	4,9	85,6	4,6	90,7	5,1
Diazinon	79,8	8,5	109,7	6,7	77,6	5,8
Dichlorvos	76,2	18,4	76,5	2,9	93,0	3,5
Dicloran	86,7	25,1	75,2	13,3	97,9	10,7
Diethofencarb	94,4	6,0	83,8	6,6	79,5	3,2
Difenoconazole	109,8	7,7	78,9	5,6	96,1	8,5
Difenoxyuron	100,3	7,4	79,1	9,0	87,0	5,5
Diflubenzuron	98,5	9,5	82,1	7,0	96,8	5,4
Dimethoate	98,5	3,3	100,1	5,4	102,1	4,1
Dimethomorph	100,1	9,4	92,5	3,9	93,4	4,3
Dimethylvinphos	99,0	6,6	76,0	5,4	88,6	2,5
Diuron	100,9	2,1	90,9	5,2	94,9	1,7
Edifenphos	107,2	12,4	89,0	5,7	96,1	8,6
Emamectin benzoate	103,9	15,3	78,6	11,3	91,0	13,9
Ethiofencarb	96,7	4,2	82,6	5,2	75,4	9,1
Ethion	95,2	18,6	118,3	6,6	76,9	27,7
Ethiprole	99,1	4,3	89,0	1,8	87,7	2,3

Peszticid	Paradicsom		Körte		Narancs	
	Átlag	RSD(%)	Átlag	RSD(%)	Átlag	RSD(%)
Ethoxyquin	102,3	3,7	92,5	5,3	96,5	6,9
Fenamiphos	91,6	6,7	80,3	3,0	89,5	2,8
Fenarimol	96,1	11,6	77,8	7,6	92,4	3,7
Fenazaquin	100,4	9,9	75,6	12,5	99,8	10,9
Fenbendazole	96,9	9,8	90,3	4,0	100,8	5,9
Fenhexamid	97,3	9,2	85,5	6,2	96,7	2,4
Fenobucarb	88,7	5,8	79,8	4,1	91,8	1,3
Fenoxycarb	103,9	11,9	72,4	10,6	86,5	4,9
Fenuron	100,1	3,1	95,1	2,1	93,7	2,4
Fipronil	55,6	35,2	74,2	44,6	67,5	29,7
Flazasulfuron	73,5	8,0	78,0	10,7	77,7	14,6
Fluacrypyrim	102,0	7,7	80,6	7,6	76,0	8,1
Fluazifop	69,2	4,3	54,2	7,5	62,6	3,9
Flufenoxuron	116,7	20,6	82,7	11,6	89,4	28,4
Fluometuron	96,9	4,9	94,5	6,9	91,3	5,2
Fluquinconazole	103,9	9,9	101,0	6,9	89,3	2,7
Fluroxypyr	78,2	11,4	76,1	3,0	79,7	4,4
Hexaflumuron	106,7	24,3	115,1	10,9	104,2	22,4
Hexythiazox	102,6	7,9	83,5	4,8	82,3	13,7
Imazalil	79,8	5,9	79,7	17,0	92,1	5,6
Imidacloprid	104,6	5,2	88,3	6,1	106,6	5,2
Indoxacarb	116,3	4,0	81,1	5,7	100,2	12,0
Iprodione	118,5	11,2	100,1	7,7	113,1	2,5
Isocarbofos	106,5	8,9	83,3	11,7	80,6	12,9
Isofenfos Metil	97,8	12,8	80,7	4,8	85,1	8,1
Isoprocab	84,6	6,0	92,5	3,3	107,9	6,3
Isoproturon	101,4	2,5	93,4	3,8	89,2	1,5
Kresoxim-methyl	98,7	6,6	90,3	3,5	79,2	8,0
Lenacil	98,8	1,9	88,3	3,4	96,6	2,4
Linuron	99,6	11,8	89,1	6,6	107,6	6,5
Lufenuron	74,3	9,1	101,8	17,7	76,0	27,4
Malathion	103,7	7,0	82,3	5,4	94,3	4,1
Mebendazole	96,5	9,3	71,5	4,4	89,3	1,1
Metalaxyl	101,2	4,0	98,7	2,9	99,8	6,9
Metamitron	91,0	2,8	85,2	4,9	67,2	4,5
Methamidophos	101,7	7,9	104,1	4,0	97,8	5,2
Methidathion	98,5	6,6	78,9	5,0	86,4	3,2
Methiocarb	111,5	11,5	109,3	8,3	102,2	1,7
Methiocarb sulfoxide	107,1	11,9	105,0	13,1	76,1	15,5
Methomyl	107,2	2,0	104,7	2,7	77,3	4,5
Methoxyfenozide	94,2	9,8	85,3	4,1	84,4	1,4
Metobromuron	111,4	23,0	98,3	18,7	101,6	16,8
Metolachlor	99,0	6,2	93,8	3,5	82,5	1,8
Metolcarb	105,5	7,6	98,1	5,1	108,0	7,0
Miconazole	97,7	25,9	100,6	18,7	118,8	11,9
Monocrotophos	99,1	4,2	101,1	3,4	98,7	2,9
Monolinuron	90,8	7,3	85,6	7,5	106,7	16,6
Monuron	100,9	3,9	92,3	4,7	97,6	3,3
Myclobutanil	94,3	7,3	84,5	3,5	83,4	2,4
Neburon	94,7	13,9	70,4	8,8	91,1	4,4
Nitempyram	83,6	12,2	75,5	9,3	88,2	11,5
Omethoate	105,7	2,3	116,1	6,4	90,7	6,0
Oxadixyl	97,6	3,9	89,8	16,6	106,1	5,8
Oxamyl	100,8	3,3	108,8	3,9	111,0	6,3
Oxfendazole	100,6	6,2	100,0	1,9	88,2	3,5
Parathion-ethyl	97,9	13,3	79,6	5,9	89,8	8,0
Penconazole	100,3	8,9	84,0	4,7	90,5	1,8
Pirimicarb	99,2	3,0	91,5	2,9	97,8	2,9

Peszticid	Paradicsom		Körte		Narancs	
	Átlag	RSD(%)	Átlag	RSD(%)	Átlag	RSD(%)
Pirimiphos-methyl	95,1	11,1	87,8	3,6	79,6	8,5
Prochloraz	87,8	11,0	85,1	3,8	91,4	5,1
Procymidone	109,9	10,5	76,0	10,9	91,2	14,5
Promecarb	98,4	5,0	88,6	7,3	92,0	2,0
Prometryn	97,8	6,6	82,9	3,6	79,8	3,6
Propamocarb	108,1	5,1	113,5	2,5	112,0	2,2
Propargite	111,4	10,1	104,6	9,2	88,6	35,6
Propazine	93,0	6,5	83,9	5,0	79,8	3,6
Pyridaben	114,3	32,4	114,8	13,4	95,7	16,5
Pyridaphenthion	94,5	7,1	77,8	6,5	83,0	4,4
Pyrimethanil	96,5	8,4	76,0	5,3	97,0	6,5
Pyriproxyfen	109,9	14,6	79,2	2,4	99,5	12,5
Quinalphos	100,4	11,4	77,2	2,9	83,8	5,7
Quinoxifen	97,2	13,4	75,7	4,1	73,8	18,4
Simazine	93,5	4,0	93,4	3,5	92,4	1,9
Spinosyn A	105,1	6,8	93,8	2,3	108,6	4,3
Spinosyn D	105,7	12,2	90,0	3,0	117,7	16,0
Spiroxamine	100,4	4,5	94,0	2,2	103,6	1,8
Tebuconazole	101,4	8,3	90,5	4,0	85,9	1,4
Tebufenozide	92,8	15,6	79,8	5,4	91,6	6,4
Tebufenpyrad	116,6	7,9	77,6	5,5	86,3	12,1
Teflubenzuron	115,5	7,3	75,5	8,3	107,2	15,7
Terbuthylazine	95,3	7,6	81,3	3,3	87,1	3,7
Terbutryn	100,6	7,1	79,7	4,1	82,0	2,9
Thiabendazole	86,5	11,3	95,8	5,1	94,8	9,2
Thiacloprid	101,5	2,7	92,2	4,5	100,8	3,6
Thiametoxam	96,2	6,1	94,9	4,2	91,8	8,7
Thiocyclam	81,2	9,4	118,5	2,9	84,6	5,3
Thiophanate-ethyl	84,1	10,0	83,9	7,9	77,7	11,0
Tolfenpyrad	97,8	8,5	81,8	3,8	115,0	12,1
TPP	104,5	10,2	76,6	4,3	99,2	8,9
Triadimefon	93,6	8,1	92,1	5,6	79,8	2,9
Triadimenol	96,4	6,2	84,4	6,4	100,1	3,3
Triazophos	98,9	10,7	75,4	5,5	80,8	2,5
Triclocarban	115,8	19,6	100,2	21,1	115,4	28,1
Trifloxystrobin	116,7	8,5	76,5	7,0	88,7	10,4
Triflumizol	86,0	9,6	96,6	3,6	83,0	8,9
Triflumuron	105,4	4,6	71,5	8,2	99,2	7,1
XMC	98,0	6,2	92,6	24,4	96,5	10,5

4. táblázat Kimutatási határértékek (LODs)

Pesztyid	Kimutatási határ (LODs) (µg/kg)		
	Paradicsom	Körte	Narancs
Acephate	5	5	1
Acetamiprid	0,5	0,25	0,25
Aclonifen	5	5	1
Alachlor	5	5	5
Albendazole	0,5	0,25	0,5
Aldicarb	5	1	1
Aldicarb sulfone	1	0,5	0,5
Aldicarb sulfoxide	1	1	1
Anilofos	1	0,5	1
Atrazine	0,1	0,5	1
Azinphos-ethyl	1	1	1
Azoxystrobin	1	0,25	0,1
Benalaxyl	1	0,5	0,5
Bendiocarb	0,5	0,25	1
Bromacil	1	0,5	1
Bromuconazole	0,5	0,25	1
Bupirimate	0,25	0,25	0,25
Buprofezin	0,25	0,5	0,25
Butocarboxin	1	1	1
Butoxycarboxin	5	1	5
Cambendazole	0,1	0,1	0,25
Carbaryl	5	10	10
Carbendazim	1	1	1
Carbofuran	0,1	0,25	0,25
Chlorbromuron	5	5	10
Chlorfenvinphos	1	1	1
Chloridazon	0,1	1	1
Chlorotoluron	0,5	1	5
Chloroxuron	5	1	1
Chromafenozide	1	1	0,5
Clofentezine	10	5	25
Cyproconazole	0,5	0,5	1
Cyprodinil	0,5	0,5	1
Cyromazine	5	5	1
Deet	0,1	0,25	0,5
Demeton-S-Metil	0,25	1	0,5
Desethylterbutylazine	1	0,25	1
Diazinon	0,1	0,1	0,1
Dichlorvos	1	1	5
Dicloran	10	5	10
Diethofencarb	0,25	0,25	0,25
Difenoconazole	0,25	1	0,5
Difenofoxuron	0,5	0,25	0,5
Diflubenzuron	5	5	5
Dimethoate	0,5	0,5	0,5
Dimethomorph	1	1	1
Dimethylvinphos	1	1	0,5
Diuron	1	1	1
Edifenphos	1	0,5	1
Enamectin benzoate	1	0,5	1
Ethiofencarb	1	1	1
Ethion	1	1	1
Ethiprole	5	1	1
Ethoxyquin	1	5	5
Fenamiphos	0,5	0,5	0,25

Peszticid	Kimutatási határ (LODs) (µg/kg)		
	Paradicsom	Körte	Narancs
Fenarimol	1	1	1
Fenazaquin	1	1	1
Fenbendazole	0,25	0,1	0,1
Fenhexamid	1	1	1
Fenobucarb	0,25	0,25	0,5
Fenoxycarb	1	0,1	1
Fenuron	1	0,5	1
Fipronil	10	25	10
Flazasulfuron	1	1	1
Fluacrypyrim	0,1	0,25	0,1
Fluazifop	1	1	1
Flufenoxuron	1	1	1
Fluometuron	1	1	1
Fluquinconazole	1	1	0,25
Fluroxypyr	5	10	5
Hexaflumuron	1	5	1
Hexythiazox	1	1	1
Imazalil	1	0,1	0,1
Imidacloprid	1	0,5	0,5
Indoxacarb	1	5	5
Iprodione	10	10	10
Isocarbofos	5	10	5
Isofenfos Metil	1	1	1
Isoprocab	1	0,5	1
Isoproturon	1	0,5	1
Kresoxim-methyl	5	1	5
Lenacil	5	1	1
Linuron	1	0,5	5
Lufenuron	1	1	10
Malathion	1	0,1	0,1
Mebendazole	1	0,5	0,5
Metalaxyl	0,25	0,1	0,5
Metamitron	0,5	1	0,5
Methamidophos	5	1	1
Methidathion	1	1	1
Methiocarb	0,5	0,5	0,25
Methiocarb sulfoxide	5	5	5
Methomyl	0,5	0,5	1
Methoxyfenozide	0,5	0,5	0,5
Metobromuron	10	10	10
Metolachlor	0,5	0,25	0,25
Metolcarb	1	1	1
Miconazole	0,25	0,25	0,5
Monocrotophos	5	5	5
Monolinuron	0,25	0,5	1
Monuron	1	1	5
Myclobutanil	0,5	0,5	1
Neburon	1	0,5	1
Nitempyram	5	0,5	1
Omethoate	1	0,5	1
Oxadixyl	5	1	5
Oxamyl	0,5	0,5	0,5
Oxfendazole	0,5	0,1	0,1
Parathion-ethyl	1	1	1
Penconazole	0,25	0,25	0,25
Pirimicarb	0,25	0,1	0,25
Pirimiphos-methyl	0,1	0,1	0,1
Prochloraz	0,1	0,5	1

Peszticid	Kimutatási határ (LODs) (µg/kg)		
	Paradicsom	Körte	Narancs
Procymidone	5	0,1	10
Promecarb	0,1	0,25	1
Prometryn	0,1	0,1	0,5
Propamocarb	10	0,5	1
Propargite	10	25	25
Propazine	0,1	0,1	0,1
Pyridaben	0,5	0,25	1
Pyridaphenthion	0,25	0,5	0,5
Pyrimethanil	0,5	0,5	1
Pyriproxyfen	0,1	0,25	0,1
Quinalphos	1	0,5	0,5
Quinoxifen	1	0,25	0,25
Simazine	0,5	0,1	0,25
Spinosyn A	0,1	0,1	0,1
Spinosyn D	0,25	0,5	0,5
Spiroxamine	0,1	0,1	0,1
Tebuconazole	1	0,25	1
Tebufenozide	5	10	5
Tebufenpyrad	1	5	1
Teflubenzuron	1	5	10
Terbuthylazine	0,25	0,25	0,1
Terbutryn	0,1	0,1	0,1
Thiabendazole	5	5	5
Thiacloprid	5	1	1
Thiametoxam	1	0,25	5
Thiocyclam	5	1	0,5
Thiophanate-ethyl	5	1	5
Tolfenpyrad	1	1	1
TPP	0,1	0,1	0,1
Triadimefon	0,5	0,5	1
Triadimenol	1	1	1
Triazophos	1	0,5	1
Triclocarban	1	1	1
Trifloxystrobin	1	0,5	1
Triflumizol	0,5	0,1	0,1
Triflumuron	1	1	1
XMC	5	5	1

5. táblázat Különböző működési kromatográfiás paraméterek mellett mért értékek

Peszticid	A 15-ös keverék sorszama	Keverék-hatás (%): Jelkülönbségek a <u>150 vs 15</u> peszticidet tartalmazó keverékben	Csúcsszélesség (perc)		Retenciós idő (min) különböző módosítók (víz eluensben) alkalmazásával			
			HPLC	UHPLC	HPLC; 0,1 % hangyasav	HPLC; 5 mM ammónium- formiát	HPLC; 5 mM ammónium-acetát	UHPLC; 0,1 % hangyasav
Acephate	3	1	0,62	0,24	3,17	3,15	3,17	1,88
Acetamiprid	6	-8	0,36	0,38	11,30	11,30	11,33	4,83
Aclonifen	7	-	0,38	0,22	23,50	23,40	23,33	14,14
Alachlor	4	3	0,60	0,43	23,18	23,00	22,93	13,83
Albendazole	9	0	0,41	0,38	13,60	17,50	17,36	8,62
Aldicarb	1	31	0,36	0,35	13,90	13,90	13,86	7,79
Aldicarb sulfone	4	19	0,37	0,27	5,28	5,30	5,33	1,82
Aldicarb sulfoxide	8	-4	0,29	0,26	3,40	3,40	3,44	1,25
Anilofos	8	-26	0,43	0,23	24,70	24,60	24,54	14,72
Atrazine	4	-1	0,59	0,32	17,30	17,20	17,17	10,32
Azinphos-ethyl	3	-13	0,41	0,28	23,10	23,00	22,94	13,95
Azoxystrobin	3	-8	0,41	0,23	21,06	21,00	20,90	12,95
Benalaxyl	2	1	0,54	0,28	24,10	23,90	23,90	14,39
Bendiocarb	2	30	0,34	0,29	16,60	16,60	16,57	10,09
Bromacil	3	-31	0,36	0,28	14,23	14,20	14,14	8,43
Bromuconazole	6	-3	0,52	0,24	20,50 és 21,58	20,50 és 21,40	22,79	12,55 és 13,08
Bupirimate	7	-5	0,49	0,37	19,85	23,80	23,71	11,83
Buprofezin	10		0,54	0,33	24,90	28,80	28,75	14,00
Butocarboxin	7	0	0,41	0,41	13,00	13,00	12,96	6,75
Butoxycarboxin	1	-15	0,41	0,27	4,80	4,90	16,50	10,02
Cambendazole	9	-3	0,99	0,47	9,10	14,10	13,80	3,22
Carbaryl	3	-18	0,39	0,21	17,20	17,20	17,15	10,53
Carbendazim	7	-11	0,29	0,28	3,38	10,10	10,00	1,28
Carbofuran	10	-30	0,52	0,31	16,58	16,50	16,49	10,01
Chlorbromuron	2	-31	0,30	0,18	21,00	20,90	20,85	12,76
Chlorfenvinphos	10	-36	0,42	0,23	23,70 és 24,50	23,6	23,47 és 24,29	14,19 és 14,60
Chloridazon	1	-16	0,48	0,31	9,98	10,00	10,00	3,61
Chlorotoluron	1	-	0,39	0,29	16,59	16,60	16,58	10,21
Chloroxuron	4	-1	0,31	0,23	20,40	20,30	20,27	12,57

Peszticid	A 15-ös keverék sorszám	Keverék-hatás (%): Jelkülönbségek a <u>150 vs 15</u> peszticidet tartalmazó keverékben	Csúcsszélesség (perc)		Retenciós idő (min) különböző módosítók (víz eluensben) alkalmazásával			
			HPLC	UHPLC	HPLC; 0,1 % hangyasav	HPLC; 5 mM ammónium- formiát	HPLC; 5 mM ammónium-acetát	UHPLC; 0,1 % hangyasav
Chromafenozide	6	-2	0,46	0,24	22,70	22,50	22,45	13,73
Clofentezine	1	-9	0,37	0,19	24,90	24,80	24,72	14,82
Cyproconazole	9	-3	0,56	0,35	20,13	20,00	19,94	12,30
Cyprodinil	9	-8	0,48	0,44	18,80	23,10	23,06	11,14
Cyromazine	1	27	0,26	0,17	2,30	3,00	3,09	0,93
Deet	9	-9	0,91	0,53	17,60	17,50	17,41	10,66
Demeton-S-Metil	1	-28	0,51	0,32	15,27	15,20	15,18	9,21
Desethylterbutylazine	10	-6	0,70	0,36	15,20	15,20	15,18	9,13
Diazinon	3	-3	0,71	0,28	25,30	25,20	25,18	14,84
Dichlorvos	2	-19	0,36	0,37	15,50	15,40	15,40	9,26
Dicloran	5	-8	0,3	0,18	19,60	14,20	14,12	8,45
Diethofencarb	7	-31	0,41	0,24	20,60	20,40	20,39	12,48
Difenoconazole	8	-42	0,95	0,35	23,59 dupla csúcs	23,6	23,38 és 23,54	14,25
Difenoconazole	8	-7	0,39	0,25	17,56	17,60	17,57	11,03
Diflubenzuron	2	3	0,35	0,25	22,20	23,20	22,00	13,48
Dimethoate	5	-2	0,48	0,35	11,20	11,20	11,24	4,58
Dimethomorph	10	-10	0,84	0,33	18,80 és 19,10	19,1	18,59 és 19,00	11,70 és 11,93
Dimethylvinphos	4	6	0,36	0,24	21,10	21,00	20,94	12,67
Diuron	1	-21	0,44	0,31	17,70	17,6	17,57	10,85
Edifenphos	5	-3	0,38	0,25	23,30	23,20	23,14	14,00
Emamectin benzoate	6	-8	0,27	0,49	18,50 és 19,20	24,40	27,02	12,80
Ethiofencarb	3	-7	0,60	0,30	17,80	17,80	17,73	10,86
Ethion	8	-4	0,48	0,20	28,60	28,40	28,38	16,80
Ethiprole	8	-2	0,54	0,25	20,10	20,10	19,96	12,42
Ethoxyquin	4	-	0,30	0,55	15,70	23,90	23,79	9,23
Fenamiphos	1	-7	0,65	0,29	20,80	20,60	20,58	12,71
Fenarimol	5	-26	0,41	0,23	20,50	20,40	20,35	12,56
Fenazaquin	6	-5	0,48	0,29	27,80	28,00	28,05	16,19
Fenbendazole	8	-8	0,44	0,28	16,47	18,90	18,80	10,46
Fenhexamid	7	-13	0,44	0,23	21,30	21,10	20,94	12,96
Fenobucarb	8	-9	0,45	0,36	20,60	20,40	20,39	12,45
Fenoxycarb	5	-6	0,38	0,25	22,60	22,50	22,42	13,71
Fenuron	2	-11	0,63	0,39	10,02	10,00	9,98	3,55
Fipronil	5	109	0,26	0,17	24,30	24,20	24,10	14,61

Peszticid	A 15-ös keverék sorszáma	Keverék-hatás (%): Jelkülönbségek a <u>150 vs 15</u> peszticidet tartalmazó keverékben	Csúcshélesség (perc)		Retenciós idő (min) különböző módosítók (víz eluensben) alkalmazásával			
			HPLC	UHPLC	HPLC; 0,1 % hangyasav	HPLC; 5 mM ammónium- formiát	HPLC; 5 mM ammónium-acetát	UHPLC; 0,1 % hangyasav
Flazasulfuron	2	-29	0,46	0,25	19,00	11,20	7,29	11,81
Fluacrypyrim	2	-5	0,51	0,22	26,60	26,40	26,35	15,73
Fluazifop	1	2	0,41	0,23	20,30	12,30	11,75	12,52
Flufenoxuron	5	-7	0,45	0,21	27,50	27,30	27,27	16,31
Fluometuron	5	-31	0,44	0,32	17,30	17,2	17,18	10,55
Fluquinconazole	8	-2	0,41	0,24	21,50	21,40	21,32	13,11
Fluroxypyr	4	-23	0,33	0,23	14,50	4,30	4,02	8,94
Hexaflumuron	2	-33	0,43	0,20	25,06	24,90	24,83	15,01
Hexythiazox	7	-1	0,40	0,22	28,30	28,10	28,09	16,56
Imazalil	2	-5	0,34	0,63	13,90	22,10	21,87	9,50
Imidacloprid	3	-9	0,41	0,32	10,32	10,40	10,35	3,86
Indoxacarb	9	8	0,34	0,20	26,20	26,00	25,93	15,58
Iprodione	7	90	0,42	0,20	22,70	22,50	22,46	13,67
Isocarbofos	2	11	0,38	0,15	20,30	20,20	20,17	12,42
Isofenfos Metil	5	-27	0,42	0,22	25,40	25,20	25,19	15,04
Isoprocab	8	2	0,57	0,29	18,70	18,60	18,62	11,35
Isoproturon	10	-8	0,44	0,27	17,60	17,50	17,44	10,78
Kresoxim-methyl	4	-7	0,40	0,21	24,20	24,00	23,96	14,48
Lenacil	8	-15	0,54	0,30	15,11	15,00	14,97	9,31
Linuron	9	-6	0,43	0,22	20,60	20,50	20,49	12,54
Lufenuron	3	-6	0,31	0,19	26,80	26,60	26,55	15,93
Malathion	2	4	0,55	0,24	23,03	22,90	23,00	13,86
Mebendazole	10	-4	0,36	0,27	13,70	15,20	15,10	8,59
Metalaxyl	6	-31	0,57	0,26	17,50	17,40	17,34	10,78
Metamitron	10	-19	0,41	0,32	9,20	9,30	9,31	3,11
Methamidophos	4	-49	0,41	0,27	3,20	3,10	3,13	1,16
Methidathion	10	-7	0,43	0,24	20,70	20,60	20,59	12,60
Methiocarb	10	2	0,54	0,24	20,27	20,20	20,11	12,36
Methiocarb sulfoxide	8	12	0,21	0,25	8,14	8,1	21,74	9,99
Methomyl	5	-10	0,43	0,25	6,20	13,5	6,18	2,09
Methoxyfenozide	3	-3	0,35	0,26	22,30	22,20	22,13	13,54
Metobromuron	7	-16	0,35	0,18	18,58	18,50	18,48	11,29
Metolachlor	10	-29	0,60	0,24	22,96	22,80	22,73	13,68
Metolcarb	9	33	0,54	0,35	15,15	15,10	15,12	8,88

Peszticid	A 15-ös keverék sorszáma	Keverék-hatás (%): Jelkülönbségek a <u>150 vs 15</u> peszticidet tartalmazó keverékben	Csúcshatár (perc)		Retenciós idő (min) különböző módosítók (víz eluensben) alkalmazásával			
			HPLC	UHPLC	HPLC; 0,1 % hangyasav	HPLC; 5 mM ammónium- formiát	HPLC; 5 mM ammónium-acetát	UHPLC; 0,1 % hangyasav
Miconazole	2	-13	0,42	0,56	17,70	27,30	27,08	12,00
Monocrotophos	2	-35	0,67	0,30	4,80	4,80	4,77	1,64
Monolinuron	4	-3	0,47	0,30	17,90	17,90	17,85	10,88
Monuron	7	-28	0,36	0,28	14,58	14,60	14,53	8,65
Myclobutanil	6	-6	0,60	0,27	21,20	21,00	21,02	12,93
Neburon	6	-2	0,49	0,27	23,30	23,10	23,09	13,98
Nitempyram	10	-18	0,29	0,33	4,57	4,40	4,36	1,63
Omethoate	6	-32	0,22	0,26	3,30	2,30	3,29	1,21
Oxadixyl	5	-9	1,00	0,78	14,50	14,50	14,43	8,88
Oxamyl	3	-4	0,51	0,26	5,05	5,00	5,01	1,73
Oxfendazole	4	-17	0,41	0,35	10,34	11,60	11,60	4,10
Parathion-methyl	7	-	0,45	0,23	24,67	24,50	24,46	14,69
Penconazole	4	-6	0,40	0,26	22,40	22,30	22,25	13,47
Pirimicarb	6	-8	0,58	0,54	6,60	16,30	16,30	2,28
Pirimiphos-methyl	4	-13	0,50	0,27	25,30	26,20	26,17	14,72
Prochloraz	3	-14	0,38	0,49	19,50	22,90	22,79	12,09
Procymidone	1	1	0,41	0,21	23,00	22,90	22,82	13,82
Promecarb	5	5	0,60	0,28	21,14	21,00	20,95	12,78
Prometryn	6	4	0,60	0,61	16,35	21,50	21,43	9,82
Propamocarb	5	-17	0,31	0,39	3,20	3,80	4,29	1,19
Propargite	9	4	0,43	0,18	29,00	28,80	28,77	17,00
Propazine	6	-2	0,60	0,31	19,78	19,60	19,59	11,87
Pyridaben	10	-8	0,45	0,23	29,60	29,40	29,38	17,28
Pyridaphenthion	1	-6	0,46	0,25	21,70	21,60	21,52	13,26
Pyrimethanil	3	-5	0,73	0,43	15,60	19,90	19,83	8,56
Pyriproxyfen	4	-15	0,42	0,23	27,40	27,30	27,25	16,12
Quinalphos	3	-31	0,48	0,24	24,10	23,90	23,88	14,37
Quinoxifen	7	-14	0,51	0,26	25,90	26,30	26,24	15,18
Simazine	6	-4	0,38	0,33	14,50	14,40	14,38	8,20
Spinosyn A	7	7	0,39	0,77	17,50	25,70	31,06	11,93
Spinosyn D	5	0	0,44	0,47	18,30	27,80	32,90	12,46
Spiroxamine	5	2	0,52	0,59	16,17	22,50	27,27	10,91
Tebuconazole	10	-7	0,46	0,25	21,67	21,50	21,47	13,19
Tebufenozide	9	-84	0,42	0,22	23,70	23,50	23,48	14,24

Peszticid	A 15-ös keverék sorszáma	Keverék-hatás (%): Jelkülönbségek a <u>150 vs 15</u> peszticidet tartalmazó keverékben	Csúcsszélesség (perc)		Retenciós idő (min) különböző módosítók (víz eluensben) alkalmazásával			
			HPLC	UHPLC	HPLC; 0,1 % hangyasav	HPLC; 5 mM ammónium- formiát	HPLC; 5 mM ammónium-acetát	UHPLC; 0,1 % hangyasav
Tebufenpyrad	10	-20	0,45	0,24	26,30	26,10	26,07	15,47
Teflubenzuron	6	-6	0,40	0,19	25,40	25,30	25,21	15,10
Terbuthylazine	3	-3	0,60	0,27	20,30	20,20	20,14	12,24
Terbutrin	9	83	0,63	0,61	16,48	21,80	21,77	9,97
Thiabendazole	9	-14	0,22	0,24	3,60	13,50	11,44	1,36
Thiacloprid	8	-7	0,36	0,32	13,28	13,30	13,32	7,73
Thiametoxam	7	-4	0,51	0,27	7,48	7,60	7,51	2,48
Thiocyclam	2	-41	0,24	0,51	2,90	10,30	15,63	1,19
Thiophanate-ethyl	1	8	0,41	0,22	18,90	18,80	18,80	11,70
Tolfenpyrad	8	-18	0,48	0,22	26,10	26,00	25,91	15,47
TPP	6	-3	0,37	0,22	24,60	24,40	24,40	14,67
Triadimefon	9	-2	0,49	0,29	21,60	21,50	21,45	13,11
Triadimenol	4	-5	0,45	0,23	19,50 és 19,90	19,40 és 19,90	19,31 és 19,79	12,00 és 12,26
Triazophos	8	-13	0,41	0,26	22,80	22,70	22,65	13,79
Triclocarban	9	-28	0,48	0,21	24,80	22,70	24,80	14,88
Trifloxystrobin	1	0	0,43	0,24	26,40	26,20	26,18	15,66
Triflumizol	9	-17	0,54	0,49	22,90	25,00	24,93	13,67
Triflumuron	1	-11	0,37	0,23	24,08	23,90	23,64	14,48
XMC	7	-20	1,12	1,12	16,40 és 16,90 és 17,50	17,4	16,90; 17,40; 17,60	9,87; 10,19; 10,35; 10,59

6. táblázat Peszticid-csoportok lehetséges izobár átmenetekkel (a közös átmenetek vastaggal szedve).

Peszticid	HPLC retenció idő (perc)	Csúcshélesség (perc)	Kvázi molekulaion	Mennyiségi átmenet (SRM1)	Minőségi átmenet (SRM2)	Egyéb (nem monitorozott) átmenetek				
						1	2	3	4	5
Butoxycarboxim	4,8	0,41	223.0	106.0	166.0	86.1	63.0	-	-	-
Acetamiprid	11,3	0,36	223.0	126.0	56.0	90.1	-	-	-	-
Aldicarb sulfone	5,3	0,37	223.0	86.0	148.0	165.9	81.0	76.0	59.1	-
Ethiofencarb	17,8	0,60	226.0	107.0	164.0	143.9	-	-	-	-
Methiocarb	20,3	0,54	226.0	169.0	121.0	93.0	-	-	-	-
Cyprodinil	18,8	0,48	226.2	92.9	76.9	193.1	184.1	167.1	118.1	108.2
Propazine	19,8	0,60	230.0	146.0	188.0	-	-	-	-	-
Terbutylazine	20,3	0,60	230.0	174.0	146.0	131.9	96.0	79.0	-	-
Dimethoate	11,2	0,48	230.0	199.0	171.0	124.9	88.0	-	-	-
Diuron	17,7	0,44	233.0	72.0	160.0	-	-	-	-	-
Fluometuron	17,3	0,44	233.0	72.0	160.0	-	-	-	-	-
Methiocarb sulfoxide	8,1	0,21	242.0	185.0	170.0	121.9	-	-	-	-
Terbutrin	16,5	0,63	242.0	186.0	158.0	91.0	-	-	-	-
Prometryn	16,4	0,60	242.0	200.0	158.0	109.9	68.0	-	-	-

7. táblázat Detektálási paraméterek az MRM módban vizsgált 55 peszticidre + TPP kísérő sztenderdre, valamint a kimutatási határ értékei az MRM mennyiségi és az EPI screening módszer esetén. (DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CEP: Collision Cell Entrance Potential; CE: Collision Energy; CXP: Collision Cell Exit Potential)

Peszticid	MW (amu)	[M+H] ⁺ (m/z)	fragmens ions (m/z)	ion arány (%)	DP	EP	CEP	CE	CXP	retenció idő (perc)	csúcs szélesség (perc)	MRM LOD (µg/kg)	EPI LOD (µg/kg)
Acetamiprid	222.1	223.2	126.1 56.1	22	26	4.5	14	25 33	4 4	11,5	1,02	4	10
Azoxystrobin	403.4	404.0	372.0 329.0	33	31	5.5	18	19 39	12 4	22,0	1,03	1	4
Boscalid	343.2	343.0	307.0 140.0	61	56	8.5	16	25 25	10 4	22,3	0,81	4	40
Bupirimate	316.1	317.2	108.0 166.2	86	26	8.5	34	37 31	2 4	20,1	1,41	1	4
Buprofezin	305.4	306.0	201.0 116.0	93	31	4	16	17 21	4 4	25,7	1,56	1	10
Carbaryl	201.2	202.1	145.0 127.0	34	26	6	14	13 35	4 4	17,8	1,31	1	20
Carbendazim	191.2	192.2	160.0 132.0	17	36	8.5	12	23 39	4 4	3,6	1,45	1	4
Cyprodinil	225.1	226.2	76.9 93.1	80	41	4	16	55 43	4 8	19,4	1,69	4	10
Diazinon	304.3	305.0	169.0 153.0	62	36	5	16	31 25	4 4	26,5	1,29	1	1
Difenoconazole	406.3	406.1	251.0 111.0	32	41	6.5	30	31 73	4 4	24,9	1,06	1	10
Diflubenzuron	310.7	311.0	158.1 141.1	15	71	10. 5	14	19 39	4 4	23,2	0,64	20	40
Dimethoate	229.3	230.0	125.0 199.0	97	16	4.5	14	25 13	4 4	11,3	1,01	1	20
Dimethomorph	387.0	388.2	301.2 165.2	58	51	4.5	20	27 43	4 4	19,5 & 20,0	1,60	1	40
Diphenylamine	169.2	170.0	93.0 66.0	17	51	8	12	31 59	4 4	24,3	1,23	<1	<1
Fenamiphos	303.4	304.0	217.0 234.0	59	41	4	14	29 21	4 4	21,7	1,25	1	4

Peszticid	MW (amu)	[M+H] ⁺ (m/z)	fragmens ions (m/z)	ion arány (%)	DP	EP	CEP	CE	CXP	retenciós idő (perc)	csúcs szélesség (perc)	MRM LOD (µg/kg)	EPI LOD (µg/kg)
Fenazaquin	306.4	307.0	57.0 161.0	80	41	4	14	39 21	4 4	29,4	1,62	1	10
Fenhexamid	302.0	302.1	97.1 55.0	63	51	4	16	33 59	4 6	22,2	1,28	1	20
Haloxifop	361.0	362.1	316.1	*	61	7.5	16	23	8	23,5	0,78	10	
Hexythiazox	352.0	353.2	228.0 168.1	81	41	4.5	16	21 33	4 4	30,0	1,21	1	20
Imazalil	297.2	297.0	159.0 201.0	88	46	4	14	31 23	4 4	14,3	1,69	1	10
Imidacloprid	255.7	256.0	209.0 175.0	84	31	4.5	16	19 23	6 4	10,5	0,90	4	40
Indoxacarb	527.8	528.0	249.0 150.0	84	66	4	22	23 31	4 4	27,6	0,98	1	40
Isofenphos	345.4	346.0	217.0 245.0	34	16	2.5	14	29 17	6 8	28,1	0,62	1	40
Isofenphos-methyl	331.4	332.2	273.0 231.0	79	21	2.5	14	11 17	6 8	26,7	0,75	4	-
Kresoxim-methyl	313.4	314.0	206.0 116.0	59	21	9	14	11 19	4 4	25,4	1,14	20	40
Linuron	248.0	249.0	182.0 160.0	97	41	10	16	21 25	4 4	21,5	0,83	10	20
Malathion	330.4	331.1	127.0 99.1	86	26	8	16	17 29	4 4	24,1	0,84	1	40
Metalaxyl	279.3	280.0	220.0 192.0	85	31	4.5	14	17 23	4 4	18,1	1,09	1	10
Methamidophos	141.1	142.0	94.0 125.0	92	31	4.5	10	17 17	4 4	3,2	0,96	4	20
Methiocarb	225.3	226.0	169.0 121.0	73	26	9.5	14	13 23	4 4	21,1	1,20	1	-
Methiocarb-sulfone	257.3	258.1	122.1 201.1	69	36	5	16	21 13	4 4	12,7	0,98	-	-
Methiocarb-sulfoxide	241.3	242.2	185.0 122.0	35	31	4.5	14	17 37	4 4	8,4	1,37	4	20
Methomyl	162.2	163.1	106.0 88.0	94	21	4	10	13 13	4 4	6,5	1,64	4	40

Peszticid	MW (amu)	[M+H] ⁺ (m/z)	fragmens ions (m/z)	ion arány (%)	DP	EP	CEP	CE	CXP	retenciós idő (perc)	csúcs szélesség (perc)	MRM LOD (µg/kg)	EPI LOD (µg/kg)
Oxamyl	219.3	220.0	72.0 90.0	**	21	2	14	15 13	4 4	5,3	1,21	-	-
Penconazole	284.2	286.0	160.9 70.0	67	31	4.5	20	35 31	4 4	23,5	1,08	1	4
Pendimethalin	281.3	282.0	212.0 194.0	19	21	4	16	15 23	6 4	29,9	1,03	10	40
Phosalone	367.8	368.0	182.0 111.0	31	41	9.5	20	19 53	4 4	27,1	0,82	10	20
Phosmet	317.3	318.0	160.0 133.0	13	26	8.5	14	17 49	4 4	22,0	1,01	10	40
Pirimicarb	238.0	239.2	182.2 72.0	93	36	4.5	16	21 31	4 4	6,9	1,87	1	10
Pirimiphos-methyl	305.0	306.2	164.3 108.1	68	51	4.5	22	29 41	4 4	26,5	1,32	1	10
Prochloraz	376.7	378.1	310.1 268.0	37	21	4.5	24	17 21	6 8	20,2	1,16	1	20
Propamocarb	188.3	189.0	102.0 144.0	39	31	6	12	23 17	4 4	3,2	1,25	1	10
Propargite	350.5	368.2***	231.2 175.3	65	36	5.5	16	15 19	4 4	30,7	0,67	4	20
Pymetrozine	217.2	218.1	105.0 78.1	11	51	9	14	25 55	4 4	2,5	1,11	10	20
Pyraclostrobin	387.8	388.0	194.0 163.0	98	26	5	16	17 29	6 4	26,0	0,99	1	10
Pyrimethanil	199.3	200.2	107.1 82.1	62	46	7.5	12	31 35	4 4	15,9	1,47	1	10
Pyriproxyfen	321.4	322.0	96.0 185.0	62	31	2.5	20	21 29	4 4	28,9	1,48	1	4
Quinoxifen	308.1	308.0	197.0 162.0	97	61	4	14	43 61	4 4	27,3	1,26	1	20
Tebuconazole	307.8	308.1	70.0 125.0	55	41	4.5	14	41 45	4 4	22,6	1,26	1	10
Thiabendazole	201.3	202.0	175.0 131.0	84	56	6.5	14	35 43	4 4	3,8	1,66	1	4
Thiacloprid	252.7	253.0	126.0 99.0	18	51	4	16	27 57	4 4	13,6	1,55	4	20

Peszticid	MW (amu)	[M+H] ⁺ (m/z)	fragmens ions (m/z)	ion arány (%)	DP	EP	CEP	CE	CXP	retenciós idő (perc)	csúcs szélesség (perc)	MRM LOD (µg/kg)	EPI LOD (µg/kg)
Thiamethoxam	291.0	292.1	211.2 181.1	39	26	9.5	16	17 29	4 4	7,9	1,23	10	40
Thiophanate-methyl	342.4	343.1	151.1 311.1	14	26	6.5	18	25 17	4 10	15,8	1,04	4	20
TPP	326.0	327.0	152.0 215.0	78	61	12		43 33	4 4	25,9	1,07	1	-
Triadimenol	295.8	296.0	70.0 227.0	9	21	4	14	21 13	4 4	20,3 & 20,8	1,76	10	40
Trifloxystrobin	408.4	409.2	186.1 206.2	37	26	7	18	23 19	4 4	27,9	1,25	1	4

* nincs második fragmens; **érzéketlen jel; *** ammónium-addukt:[M+NH₄]⁺ (=M+18)

8. táblázat A TPP kísérő sztenderdre (0.333 mg/kg) normalizált kalibrációs egyenesek átlagos meredekségei ($\cdot 10^{-3}$) retenció szerint sorba rendezve; matrix-illesztett kalibráció esetén 12 különböző mátrixra (n = 10): 1 = paradicsom; 2 = alma; 3 = saláta; 4 = uborka; 5 = sárgarépa; 6 = gomba; 7 = szőlő; 8 = citrom; 9 = paprika; 10 = körte; 11 = burgonya; 12 = káposzta. A vastaggal jelölt átlag értékek szórása meghaladja a 20%-ot (RSD>20%). A táblázat 6480 kalibrációs egyenes meredekségének (54 peszticid \times 12 mátrix \times 10 minta) összegzése.

Peszticid	Mátrix												Teljes átlag \pm szórás, n = 12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Pymetrozine	8.2	15.7	8.3	9.4	12.1	8.0	11.5	6.0	8.8	12.2	8.1	7.3	9.6 \pm 2.6
Methamidophos	4.0	4.1	3.8	4.5	3.3	4.9	4.1	3.6	3.3	4.1	3.4	3.1	3.8 \pm 0.5
Propamocarb	13.6	15.4	13.6	14.0	14.3	15.6	15.0	14.7	12.2	13.8	12.6	12.7	14.0 \pm 1.0
Carbendazim	16.7	18.5	17.1	17.2	16.8	19.9	17.3	15.1	14.9	16.3	15.2	15.3	16.7 \pm 1.4
Thiabendazole	7.6	8.7	7.8	9.1	8.5	8.6	7.9	7.7	6.6	6.9	6.7	6.7	7.7 \pm 0.8
Methomyl	5.2	5.5	5.2	4.6	5.1	6.5	5.6	4.4	4.4	4.9	4.8	4.7	5.1 \pm 0.6
Pirimicarb	14.2	14.8	13.1	16.1	13.4	17.1	15.5	13.4	12.6	14.0	11.0	11.9	13.9 \pm 1.7
Thiamethoxam	1.7	1.9	1.7	1.4	1.8	2.0	1.6	1.4	1.5	1.8	1.5	1.4	1.6 \pm 0.2
Methiocarb-sulfoxide	7.0	7.8	8.4	8.5	13.6	11.6	9.8	7.0	8.2	10.9	9.0	9.6	9.3 \pm 1.9
Imidacloprid	1.9	2.5	2.3	1.7	2.6	2.6	2.2	1.8	1.7	2.0	2.2	2.1	2.1 \pm 0.3
Dimethoate	6.5	7.1	6.6	6.4	6.6	8.5	7.0	5.8	5.4	5.8	5.3	6.5	6.5 \pm 0.8
Acetamiprid	6.4	7.4	7.1	6.9	7.6	8.1	6.9	6.1	5.6	6.1	6.0	6.3	6.7 \pm 0.7
Methiocarb-sulfone	0.9	1.6	1.2	1.7	5.3	1.9	2.9	1.8	1.5	2.2	2.0	2.9	2.2 \pm 1.1
Thiacloprid	8.6	10.5	9.8	9.2	11.2	10.8	8.6	7.6	7.0	8.1	8.9	9.6	9.2 \pm 1.2
Imazalil	3.9	4.4	3.7	4.2	2.9	4.7	4.4	4.3	3.4	3.8	3.2	3.3	3.8 \pm 0.5
Thiophanate-methyl	8.2	8.6	7.4	7.3	8.5	8.7	8.9	7.3	6.7	7.6	7.4	7.9	7.9 \pm 0.7
Pyrimethanil	6.6	7.6	6.5	7.7	7.1	7.8	7.0	7.1	5.9	6.0	5.8	6.0	6.8 \pm 0.7
Carbaryl	14.3	15.6	14.7	12.0	17.7	18.1	15.8	10.6	12.4	13.3	11.4	15.2	14.3 \pm 2.3
Metalaxyl	15.1	17.7	16.0	16.4	16.3	18.5	17.2	17.4	13.0	13.7	14.1	16.1	16.0 \pm 1.6
Cyprodinil	3.7	3.8	3.3	3.9	3.1	3.5	4.1	3.6	3.4	3.7	2.8	3.1	3.5 \pm 0.4
Dimethomorph	4.9	5.6	5.3	4.9	5.9	6.1	5.5	5.5	4.3	4.7	5.0	5.4	5.3 \pm 0.5
Bupirimate	4.9	4.9	4.2	5.2	4.1	5.4	5.3	5.3	4.4	4.5	3.8	4.2	4.7 \pm 0.5
Prochloraz	6.1	7.0	5.8	5.5	4.5	7.4	7.0	5.3	5.6	5.6	5.7	6.1	6.0 \pm 0.8
Triadimenol	7.2	8.4	6.5	7.1	9.5	11.0	9.3	7.7	6.6	7.8	6.1	7.2	7.9 \pm 1.4
Methiocarb	8.8	10.5	9.9	7.9	11.3	11.8	10.3	9.0	8.3	8.8	9.6	10.5	9.7 \pm 1.2
Linuron	2.8	4.1	2.7	2.8	3.1	2.9	2.9	3.0	2.0	3.1	2.7	2.8	2.9 \pm 0.4

Peszticid	Mátrix												Teljes átlag ± szórás, n = 12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Fenamiphos	16.5	19.0	16.8	16.9	16.8	19.3	18.6	18.5	14.0	16.1	14.5	17.2	17.0 ± 1.6
Azoxystrobin	17.4	18.2	16.9	16.2	17.7	19.7	19.4	17.9	15.8	16.4	16.2	19.2	17.6 ± 1.3
Phosmet	4.7	5.3	5.5	4.0	7.3	7.2	6.6	3.2	4.9	6.1	5.8	6.2	5.6 ± 1.2
Fenhexamid	4.8	5.9	5.4	5.0	5.3	5.8	5.8	4.9	4.3	5.2	5.0	5.1	5.2 ± 0.4
Boscalid	2.5	3.0	2.9	2.4	3.1	3.0	3.0	2.6	2.2	2.6	2.6	2.9	2.7 ± 0.3
Tebuconazole	14.8	18.3	15.9	13.5	16.1	18.0	17.9	15.8	14.1	15.6	14.5	14.5	15.8 ± 1.5
Diflubenzuron	2.4	3.7	2.5	2.2	3.5	2.9	2.6	2.7	1.9	2.2	2.1	2.4	2.6 ± 0.5
Haloxyfop	1.0	2.4	1.2	1.1	2.5	2.8	1.0	1.3	0.8	1.1	1.2	1.0	1.4 ± 0.7
Penconazole	4.3	8.6	4.9	4.4	7.7	9.2	4.4	5.4	3.3	4.2	4.8	4.0	5.4 ± 1.9
Malathion	8.0	8.7	8.3	7.4	9.7	9.8	8.9	7.5	7.3	7.4	7.8	8.9	8.3 ± 0.8
Diphenylamine	9.1	11.2	9.8	8.8	9.8	11.4	11.0	9.2	8.3	10.0	9.3	8.4	9.7 ± 1.0
Difenoconazole	11.6	13.1	11.2	11.3	13.2	14.2	13.9	10.6	11.4	11.5	11.6	12.0	12.1 ± 1.1
Kresoxim-methyl	0.2	0.3	0.2	0.3	0.5	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3 ± 0.1
Buprofezin	27.4	28.6	24.1	26.9	26.7	26.4	31.7	27.7	25.5	24.9	22.2	25.5	26.5 ± 2.3
Pyraclostrobin	11.3	11.2	10.7	10.0	10.9	12.3	12.2	10.6	10.2	10.0	10.0	11.5	10.9 ± 0.8
Diazinon	27.6	30.7	25.2	31.6	24.4	31.3	32.6	31.7	26.7	28.2	22.3	23.6	28.0 ± 3.4
Pirimiphos-methyl	19.6	20.9	17.4	21.6	18.3	22.3	22.6	20.4	18.7	19.9	16.1	16.7	19.5 ± 2.0
Isofenphos-methyl	0.8	1.1	0.4	1.8	1.5	1.9	0.8	1.4	0.8	0.7	0.7	0.8	1.1 ± 0.5
Phosalone	3.2	4.2	2.9	3.4	3.2	2.5	3.4	3.1	2.3	3.8	3.4	2.4	3.2 ± 0.5
Quinoxifen	5.3	4.8	4.4	4.3	4.2	4.3	5.8	4.1	4.7	5.2	4.1	4.3	4.6 ± 0.5
Indoxacarb	0.9	1.0	0.9	0.8	1.0	1.0	1.1	0.8	0.8	1.0	0.9	1.1	0.9 ± 0.1
Trifloxystrobin	15.0	12.5	12.2	14.8	11.6	13.8	16.0	13.0	12.9	13.2	11.4	13.4	13.3 ± 1.3
Isofenphos	0.4	0.5	0.2	0.7	0.6	0.8	0.4	0.9	0.5	0.2	0.3	0.3	0.5 ± 0.2
Pyriproxyfen	26.2	20.4	19.6	22.9	21.1	20.0	27.9	20.1	22.9	26.6	17.8	21.5	22.2 ± 3.0
Fenazaquin	16.7	13.3	11.7	15.8	11.8	12.7	16.9	13.4	15.4	16.2	11.0	11.8	13.9 ± 2.1
Pendimethalin	2.4	1.8	1.8	2.0	1.8	1.8	2.7	1.8	1.9	2.2	1.8	2.3	2.0 ± 0.3
Hexythiazox	2.7	1.8	2.0	2.4	1.8	1.8	2.7	1.7	2.0	2.3	1.9	2.2	2.1 ± 0.3
Propargite	0.8	0.3	0.5	1.0	0.4	0.4	0.8	0.7	0.6	0.5	0.3	0.7	0.6 ± 0.2

9. táblázat A detektált peszticidek és a mért koncentráció értékek a 200 mintát felölelő egyéves monitorozás adatai alapján.

Peszticid	Gyümölcs (71 minta)			Zöldség/Más (129 minta)		
	Pozitív minták száma	Min - Max (mg/kg)	Határérték túllépések száma	Pozitív minták száma	Min - Max (mg/kg)	Határérték túllépések száma
Gombaölő szerek (Fungicidek)						
Azoxystrobin	1	0.109		14	0.010-0.551	
Boscalid	2	0.017-0.029		1	10.4	1
Bupirimate	2	0.005-0.008		-	-	
Carbendazim	4	0.041-0.064		4	0.041-0.352	2
Cyprodinil	7	0.010-0.364		-	-	
Diethofencarb	-	-		1	0.030	
Difenoconazole	1	0.025		-	-	
Dimethomorph	-	-		1	0.176	1
Diphenylamine	16	0.007-0.081	1	29	0.006-0.202	4
Fenhexamid	1	0.189		-	-	
Imazalil	15	0.030-6.655		-	-	
Metalaxyl	2	0.087-0.111		2	0.032-0.060	
Myclobutanyl	1	0.102		-	-	
Prochloraz	3	1.045-5.043		-	-	
Propamocarb	-	-		5	0.100-0.475	
Pyraclostrobin	1	0.069		1	0.230	
Pyrimethanil	2	0.010-0.039		-	-	
Quinoxifen	2	0.010-0.012		-	-	
Spiroxamine	1	0.189		-	-	
Tebuconazole	-	-		1	0.040	
Thiabendazole	10	0.035-0.899		-	-	
Triadimenol	1	0.018		-	-	
Gyomirtó szerek (Herbicidek)						
Haloxifop	-	-		1	0.637	1
Linuron	-	-		1	0.314	
Rovarirtó szerek (Inszekticidek)						
Acetamiprid	1	0.035		3	0.037-0.098	
Buprofezin	-	-		1	0.043	
Diflubenzuron	4	0.020-0.127		-	-	
Diazinon	2	0.020-0.029	1	-	-	
Dimethoate	-	-		1	0.244	1
Indoxacarb	-	-		1	0.054	
Phosmet	2	0.370-0.447		-	-	
Pirimicarb	2	0.022-0.024		-	-	
Pymetrozine	-	-		1	0.199	
Pyriproxyfen	-	-		1	0.010	
Thiamethoxam	-	-		2	0.111-0.290	

10. táblázat GC×GC TOFMS 1. és 2. dimenziós retenciók

Peszticid	oldószerben		paprikában		borsban	
	1. retenciós idő (perc)	2. retenciós idő (mp)	1. retenciós idő (perc)	1. retenciós idő (perc)	2. retenciós idő (mp)	1. retenciós idő (perc)
Chlorothalonil	10,8	4,47	10,8	4,35	11,2	4,28
Endosulfan alpha-	16,3	3,87	16,3	3,78	16,7	3,66
Endosulfan beta-	18,4	4,31	18,4	4,21	18,8	4,15
Endosulfan sulfate	19,8	4,38	20,1	4,23	20,1	4,18
Lindan (γ -HCH)	9,9	3,71	9,8	3,60	10,1	3,52
TPP	20,8	4,59	20,8	4,42	21,1	4,30
Vinclozolin	12,2	3,76	12,1	3,68	12,4	3,59

11. táblázat Kalibrációs egyenesek linearitása GC-MS/MS műszeren

Peszticid	oldószer		paprika		tea	
	egyenlet	R ²	egyenlet	R ²	egyenlet	R ²
Chlorothalonil	y=1061x-40467*	0,9708	y=3151x-51220	0,9877	y=7750x-99460	0,9984
Endosulfan alpha-	y=1751x-641	0,9993	y=3835x-792	0,9912	y=1596x-1133	0,9997
Endosulfan beta-	y=648x-19045	0,9902	-	-	y=589x-12329	0,9899
Endosulfan sulfate	y=218x-5169	0,9884	y=161x-2477	0,9982	y=461x-1693	0,9992
Lindan (γ-HCH)	y=2730x-19624	0,9989	y=6880x-10038	0,9963	y=2946x-2321	0,9997
TPP	y=3404x-37273	0,9987	y=3574x-25667	0,9960	y=5435x-21872	0,9995
Vinclozolin	y=5479x-52722	0,9988	y=15341x-42862	0,9991	y=5293x-36613	0,9987

*: csak 3 pontos kalibráció volt lehetséges

12. táblázat Kalibrációs egyenesek linearitása GC×GC TOFMS műszeren

Peszticid	oldószer		paprika		tea	
	egyenlet	R ²	egyenlet	R ²	egyenlet	R ²
Chlorothalonil	-	-	-	-	-	-
Endosulfan alpha-	y = 179x - 4067	0,9894	y = 284x - 6021	0,9991	y=242x-2028	0,9902
Endosulfan beta	y = 164x - 4687	0,9904	y = 310x - 4119	0,9880	y=243x-4088	0,9898
Endosulfan sulfate	y = 52x - 5075	0,9314	y = 97x - 2489	0,9960	y=151x-3341	0,9943
Lindan (γ-HCH)	y = 769x - 9978	0,9939	y = 1091x + 3229	0,9888	y=623x+1761	0,9951
TPP	y = 1289x - 19847	0,9910	y = 2874x - 36438	0,9958	y=2372x-25449	0,9919
Vinclozolin	y = 385x - 3328	0,9958	y = 628x - 9378	0,9975	y=281x-5624	0,9966

13. táblázat Kimutatási határ (LOD) és a mennyiségi meghatározás (LOQ) határ értékei az injektált extraktumban

Peszticid	GC-MS/MS						GC×GC TOFMS					
	oldószer		paprika		fekete tea		oldószer		paprika		fekete tea	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
chlorothalonil	<u>100</u>	<u>250</u>	<u>5</u>	<u>15</u>	<u>5</u>	<u>15</u>	<u>15</u>	<u>50</u>	<u>5</u>	<u>15</u>	=	=
endosulfan alpha-	5	15	5	15	5	15	5	20	10	30	10	30
endosulfan beta-	25	75	<u>50</u>	<u>150</u>	10	30	10	25	10	30	10	30
endosulfan sulfate	25	75	10	30	10	30	<u>30</u>	<u>100</u>	20	50	20	50
lindan (γ -HCH)	5	15	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5
TPP	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5
vinclozoline	10	30	1	5	1	5	1	5	5	15	5	15

14. táblázat Kinyerési hatások értékei

Peszticid	paprika		fekete tea	
	"hagyományos dúsítás"	"közvetlen dúsítás"	"hagyományos dúsítás"	"közvetlen dúsítás"
Chlorothalonil	<u>20(33)</u>	<u>38(27)</u>	65(4)	77(8)
Endosulfan alpha-	90(2)	89(24)	66(3)	74(9)
Endosulfan beta-	<u>x(x)</u>	<u>x(x)</u>	70(5)	78(2)
Endosulfan sulfate	81(3)	84(7)	77(3)	84(2)
Lindan (γ -HCH)	73(24)	82(25)	<u>36(6)</u>	<u>32(5)</u>
TPP	94(14)	92(31)	78(3)	87(1)
Vinclozolin	77(16)	76(7)	86(7)	85(8)

15. táblázat Fűszerpaprikára és teára vonatkozó határértékek (MRLs) és a mennyiségi meghatározás határai (LOQs). Minden adat a mérendő kis víztartalmú mantra vonatkozik.

Peszticid	EU határérték (MRLs; mg/kg)		Codex Alimentarius határérték (MRLs; mg/kg)		Regisztrálva		Mennyiségi meghatározás határa (LOQ)			
	Paprika ^a	Tea ^b	Paprika ^a	Tea ^b	India	Kína	paprika		Fekete tea	
							GC-MS/MS	GC×GC TOFMS	GC-MS/MS	GC×GC TOFMS
chlorothalonil	2	0,1	70	-	IGEN	IGEN	0,15	<u>0,15</u>	0,15	-
endosulfan alpha*							0,15	0,3	0,15	0,3
endosulfan beta*	1	30	-	30	IGEN	IGEN	<u>1,5</u>	0,3	0,3	0,3
endosulfan sulfate*							0,3	0,5	0,3	0,5
lindan	0,01	0,05	-	-	IGEN	NEM	0,05	0,05	0,05	0,05
vinclozolin	3	0,1	30	-	NEM	IGEN	0,05	0,15	0,05	0,15

*: endosulfan (az alpha- és beta-izomerek, valamint az endosulfan sulphate összege endosulfan-ra vonatkoztatva)

^a: csili paprikával együtt

^b: *Camellia sinensis* levelek és szár szárított, érlelt vagy bármi más formában

Megjegyzés: TPP (kísérő sztenderd) nem szerepel a listában

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani szűkebb családomnak: Édesanyámnak és öcsémnek Máténak, akik a doktori tanulmányaim rögzös útján mindvégig támogattak.

Köszönettel tartozom témavezetömnek, Dr. Fodor Péternek, akinek invitálására bekapcsolódhattam az Alkalmazott Kémia Tanszék munkájába, és aki doktori munkám során anyagi forrásokból és szakmailag támogatott.

Külön szeretném megköszönni Dr. Abrankó Lászlónak és Dr. Dernovics Mihálynak, akik publikációim és előadásaim tökéletesítéséhez objektív, hasznos tanácsokkal láttak el.

Szeretném megköszönni, továbbá a tanszék összes dolgozójának, illetve doktorandusz társaimnak, akik szakmai tanácsukkal és az oldott légkör megteremtésével segítették munkámat.

Az Almería-i Egyetem Analitikai Kémia Tanszékének minden dolgozójának, kiemelten professzor Dr. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba-nak, hogy másfél évet dolgozhattam a világszínvonalú laboratóriumban, ahol növényvédőszer-kutatásaimat szakmailag teljes mértékben támogatta és kontrollálta.

Doktori munkám elvégzéséhez nyújtott anyagi támogatásért köszönettel tartozom a következő intézményeknek:

- Magyar Állami Doktori Ösztöndíj
- Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj
- Erasmus Ösztöndíj
- Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal – Mecenatura
- Spanyol-magyar TÉT ösztöndíj
- Dr. Dernovics Mihály MERG-CT-2006-044951 Marie Curie Ösztöndíj-forrása